

**Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Curso de Agronomia**

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTOCOLO PARA
MICROPROPAGAÇÃO DE VETIVER (*Chrysopogon
zizanioides* (L.) Roberty).**

Couglan Hilter Sampaio Cardoso

Florianópolis/SC, Junho de 2011

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Curso de Agronomia

**Desenvolvimento de um protocolo para micropropagação
de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty).**

Relatório de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de
Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Santa
Catarina (UFSC), como requisito parcial para obtenção do grau
de **Engenheiro Agrônomo**.

Nome do Aluno: Couglan Hilter Sampaio Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra

Supervisor: Dr. Douglas André Steinmacher

Florianópolis/SC, Junho de 2011

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Agrárias
Curso de Agronomia

Assinaturas da Comissão Examinadora aprovando o Relatório de Conclusão de Curso

**Desenvolvimento de um protocolo para micropropagação
de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty).**

elaborado por

Couglan Hilter Sampaio Cardoso

como requisito parcial para obtenção do grau de
Engenheiro Agrônomo

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Miguel Pedro Guerra
(FIT/CCA/UFSC)

Dr. Douglas André Steinmacher
(FIT/CCA/UFSC)

Engenheiro Agrônomo Yohan Fritsche
(FIT/CCA/UFSC)

Florianópolis, 28 de Junho de 2011

AGRADECIMENTOS:

Agradeço primeiramente a Deus;

Aos meus pais, Ademir João Cardoso e Rosângela Rocha Sampaio Cardoso, e minha irmã Danna, pelo carinho e incentivo de uma vida;

Às amizades que cultivei durante os seis anos da faculdade e que sempre levarei em pensamento;

Ao pessoal do LFDGV, em especial à Clarissa Capestrano, ao Ramon Felipe Scherer e Yohan Fritsche pelos conhecimentos repassados;

Ao professor Miguel Pedro Guerra e Douglas Steinmacher pelo apoio e confiança demonstrada;

Ao Carlos Tadeu Freitas da Silva Jr. por me “apresentar” ao Capim Milagroso;

À UFSC pela infra-estrutura.

RESUMO: O Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) é uma planta de origem Asiática, especificamente do Sul da Índia e sua utilização se limitava à produção de óleo essencial até meados da década de 1980. Por apresentar características morfológicas, fisiologias e ecológicas particulares da espécie, é conhecido como Capim Milagroso na Ásia. Servindo-se das características do Vetiver, o Banco Mundial, em 1986, desenvolveu o Sistema Vetiver (SV) como uma maneira sustentável para o controle de erosão e recuperação de áreas degradadas. Por não apresentar estolões ou sementes férteis o Vetiver não é considerado uma planta invasora e sua propagação é realizada utilizando partes maduras de touceiras da planta-mãe, tais como mudas de raízes nuas, coroa e colmos. Uma alternativa para a produção massal de mudas de Vetiver é a cultura de tecidos. Neste contexto, o incentivo do uso do SV para preservação/recuperação de áreas degradadas deve ser estimulado aqui no Brasil e protocolos específicos devem ser desenvolvidos para aperfeiçoar a propagação *in vitro* de Vetiver para produção de mudas para o controle de erosão e recuperação de áreas degradadas. O desenvolvimento de um protocolo para micropropagação de Vetiver foi conduzido no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal do CCA/UFSC durante o período de 11/03/2010 até 28/06/2011. Este protocolo procurou estabelecer uma maneira eficaz para o estabelecimento de culturas assépticas, multiplicação de brotos, pré-aclimatização *in vitro* e aclimatização. Os experimentos realizados foram: a) estabelecimento de culturas assépticas; b) multiplicação de brotos e incremento de massa fresca; c) multiplicação de brotos sob diferentes densidades de meio de cultura (sólido e líquido) e de agentes geleificantes (ágar e fita-gel); d) efeito do GA₃ e ANA em aglomerados visando alongamento de colmos e desenvolvimento de folhas; e) influência de diferentes substratos na aclimatização do Vetiver. Os resultados demonstraram que: a) o experimento de desinfestação de gemas basais de colmo não apresentou resultados estatísticos concretos e deve ser levado em desconsideração, porém foi possível estabelecer uma cultura asséptica; b) o meio de cultura suplementado com ANA (2 µM) + BAP (8 µM) obteve melhor resultado para desenvolvimento de brotos e o meio contendo ANA (2 µM) + BAP (2 µM) apresentou maior incremento de massa fresca; c) o maior desenvolvimento de brotos ocorreu em meio de cultura líquido; d) o meio de cultura não suplementado com ANA favorecia o desenvolvimento de colmos por aglomerado e de folhas por colmo, todos os tratamentos suplementados com GA₃ não diferiam quanto desenvolvimento de colmos e nem do número de folhas por colmo; e) os diferentes substratos (composto orgânico, casca de arroz carbonizado e espuma fenólica) não apresentaram diferenças estatísticas quanto ao crescimento da folha e da raiz. Realizando os estágios pré-determinados acima foi possível obter mudas de Vetiver.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	III
1 INTRODUÇÃO:.....	1
2 OBJETIVOS:	2
3 JUSTIFICATIVAS:	3
4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:	5
4.1 - Características gerais da planta:.....	5
4.2 - Sistema Vetiver:	7
4.2.1 - Conservação do solo e de sua umidade:	8
4.2.2 - Prevenção e tratamentos de áreas contaminadas:	10
4.2.3 - Vantagens e desvantagens do Sistema Vetiver:	12
4.3 - Outras utilidades:.....	13
4.4 – Propagação do Vetiver:.....	15
4.5 - Biotecnologia:	16
4.5.1 - Cultura de Tecidos:	17
4.5.5.1 - Laboratório de Cultura de Tecidos de plantas:	18
4.5.5.2 - Metodologia geral da Micropropagação:.....	19
4.5.5.3 - Meio de cultura:	21
4.5.5.3 - Reguladores de crescimento:	22
5 MATERIAL E MÉTODOS:.....	24
5.1 - Obtenção de culturas assépticas:	24
5.2 - Efeitos do ANA e BAP na multiplicação de brotos e incremento de massa fresca:	25
5.3 - Efeitos de diferentes densidades de meio de cultura e de agentes geleificantes na multiplicação de brotos:.....	26
5.4 - Efeito do GA₃ e ANA no desenvolvimento de plântulas:	27
5.5 - Aclimatização de plântulas de Vetiver:.....	28
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO:	29
6.1 - Obtenção de culturas assépticas:	29
6.2 - Efeitos do ANA e BAP na multiplicação de brotos e incremento de massa fresca:	31
6.3 - Efeitos de diferentes densidades de meio de cultura e de agentes geleificantes na multiplicação de brotos:.....	33
6.4 - Efeitos do GA₃ e ANA no desenvolvimento de plântulas	36
6.5 - Aclimatização de plântulas de Vetiver	38
7 CONCLUSÕES:.....	39
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: a) planta de Vetiver cultivada em vaso, observar o sistema radicular da planta ao lado com aproximadamente 6 meses de idade; b) gemas desenvolvidas por micropropagadas de Vetiver em meio de cultura suplementado com 2 μ M ANA / 4 μ M BAP (30 dias); c) Relação do crescimento de raízes de *Chrysopogon zizanioides* (L) Roberty e *C. nemoralis* (foto c; adaptado TRUONG, et al. 2006). 6

Figura 2: Gemas basais do colmo de *Chrysopogon zizanioides* a) gemas basais de diferentes tamanhos, observar os primórdios foliares; b) gemas basal induzida em meio de cultura MS suplementado com 2 μ M de ANA e 4 μ M BAP. 30

Figura 3: Desenvolvimento de *Chrysopogon zizanioides* em meios de cultura contendo diferentes concentrações de reguladores de crescimento (ANA e BAP). a) plantas desenvolvidas em meio suplementado com ANA (2 μ M) + BAP (8 μ M); b) detalhe do aglomerado de gemas, com aproximadamente 15 brotos, desenvolvido em meio de cultura suplementado ANA (2 μ M) + BAP (8 μ M) e ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M); c) intenso desenvolvimento radicular em meio de cultura isento de reguladores de crescimento; d) detalhe da proeminência na base do colmo quando o meio era suplementado com ANA (8 μ M) + BAP (2 μ M). 32

Figura 4: Desenvolvimento de clusters em meios de cultura em diferentes densidades e agentes geleificantes de *Chrysopogon zizanioides*. a e b) desenvolvimento foliar em meio de cultura com ágar; c e d) desenvolvimento de clusters em meio de cultura líquido. 35

Figura 5: Desenvolvimento de clusters de *Chrysopogon zizanioides* em meio de cultura MS suplementado com GA₃ e ANA. a) observar a quantidade de raízes e vigor das folhas, meio sem reguladores de crescimento; b) aglomerados com sinais de fitotoxidez; c) aglomerado com crescimento homogêneo em meio suplementado com 10 μ M de GA₃; d) expansão foliar em meio suplementado com 15 μ M de GA₃. 37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Taxa de contaminação e sobrevivência das gemas axilares de *Chrysopogon zizanioides* quando desinfestadas em diferentes tempos de imersão (5, 10, 15 min) em hipoclorito de sódio..... 30

Tabela 2: Incremento de massa fresca e desenvolvimento de brotos de *Chrysopogon zizanioides* submetidos a tratamentos com reguladores (ANA e BAP) de crescimento em diferentes concentrações..... 31

Tabela 3: Número de brotos de *Chrysopogon zizanioides* desenvolvidos em diferentes consistências de meio de cultura e agentes geleificantes. 33

Tabela 4: Influência do meio de cultura MS suplementado com GA₃ e ANA no desenvolvimento de colmos por cluster e de folhas por colmo em aglomerados de gemas de *Chrysopogon zizanioides*. 36

Tabela 5: Crescimento de folha e raiz de *Chrysopogon zizanioides* cultivados em diferentes substratos. 38

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Siglas	Significado
°C	Grau(s) celsius
μM	Micromolar
2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
6-BA	6-Benzylaminopurine
AIA	Ácido indolacético
AIB	Ácido indolbutírico
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	Benziladenina
CV's	Coeficientes de variação
GA ₃	Ácido Giberélico
HCl	Ácidoclorídrico
LFDGV	Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal
NaOH	Hidróxido de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinila
SNK	Teste de separação de médias Student-Newman-Keuls
SV	Sistema Vetiver

1 INTRODUÇÃO:

O Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) é uma planta de origem Asiática, especificamente do Sul da Índia. Até meados da década de 1980 sua utilização praticamente limitava-se à produção do óleo essencial.

Conhecido na Ásia como Capim Milagroso, o Vetiver apresenta características morfológicas, fisiologias e ecológicas intrínsecas da espécie. A planta resiste às mais diversas condições edafoclimáticas, sobrevive em condições de secas prolongadas, incêndios, inundações e temperaturas extremas (-15°C a +55°C). Quando submetido ao intenso tráfego/pressão de pastoreio, soterramento por sedimentos ou poda severa rapidamente se recompõe emitindo novos perfilhos. Tolerância solos sódicos, salinos, alcalinos, uma ampla faixa de pH (3.3 a 12.5), altos níveis de saturação de Al, Mn e diversos metais pesados. Por não apresentar sementes férteis ou estolões o Vetiver não é considerado uma planta invasora.

Servindo-se das características do Vetiver, em 1986 o Banco Mundial promoveu, baseado na Tecnologia do Capim Verde, o Sistema Vetiver (SV) como uma maneira sustentável para o controle de erosão e recuperação de áreas degradadas. A aplicação dessa Técnica na Bioengenharia consiste no cultivo em fileiras do Vetiver, formando cordões vegetativos que atuam como barreiras vivas que recobrem o solo, diminuindo a ação direta do impacto da gota da chuva sob sua superfície e reduzindo a velocidade superficial da água. A conservação da umidade do solo e o resgate de nutrientes ao longo do perfil melhoram o micro-clima e proporciona condições favoráveis para o estabelecimento de outras plantas semeadas ou voluntárias no local. Além do mais as características morfológicas e fisiológicas únicas da espécie tornam o Vetiver uma excelente planta a ser empregada na proteção ambiental, em especial na prevenção e tratamento do solo e da água contaminada, podendo ser utilizado em tratamentos de águas residuais e fitoremediação de solos contaminados.

As grandes vantagens do SV são: o baixo custo de implantação e longevidade da vida-útil da obra quando comparado com métodos da engenharia convencional; uma vez estabelecido, é virtualmente livre de manutenção. O custo de implantação desse Sistema é, em média, 30% do valor das soluções de engenharia tradicionais. Experimentos demonstram que o uso do SV, combinado com outras técnicas de conservação do solo, tem se revelado muito eficaz e de baixo custo na Bioengenharia. No entanto, convém sublinhar que as chaves mais importantes para o sucesso do projeto são: aplicação de técnicas corretas no plantio, um bom material a ser cultivado e a elaboração de um projeto específico para cada área.

Além do uso do Vetiver na conservação do solo/água, outros usos/utilidades potenciais podem ser considerados. Há mais de três mil anos a utilização do Vetiver se restringia, em grande parte da Ásia, à extração do óleo essencial de suas raízes, mas suas folhas podem ser utilizadas na alimentação de animais, produção de etanol, complemento para fabricação do papel, construção civil, paisagismo, artesanatos, entre outros.

Como a reprodução do Vetiver é exclusivamente vegetativa a produção de mudas é realizada principalmente em viveiros mantidos a campo, necessitando de um amplo espaço para o cultivo de plantas matrizes. A forma mais comum de se propagar mudas de Vetiver é a propagação das partes maduras de touceiras da planta-mãe, tais como mudas de raízes nuas, coroa e colmos. Uma alternativa para a produção massal de mudas de Vetiver para recuperação de áreas degradadas é a cultura de tecidos.

Este trabalho procurou estabelecer métodos para elaboração de um protocolo para propagação *in vitro* de Vetiver, visando produção massal de mudas para recuperação de áreas degradadas.

2 OBJETIVOS:

O objetivo geral do presente estudo foi desenvolver um protocolo de propagação *in vitro* de Vetiver (*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty) visando produção massal de mudas para recuperação de áreas degradadas.

Os objetivos específicos do trabalho são:

- Avaliar a eficiência do hipoclorito de sódio na desinfestação de gemas basais do colmo submetidos a diferentes tempos de imersão para o estabelecimento de culturas assépticas.
- Comparar o efeito de diferentes concentrações combinadas dos reguladores de crescimento ANA e BAP na multiplicação de brotos e no incremento de peso de explantes de Vetiver.
- Determinar o efeito do meio de cultura líquido e sólido (água e fita-gel) na multiplicação de brotos.
- Avaliar a influência dos reguladores de crescimento GA₃ e ANA no desenvolvimento de colmos em aglomerados e o número de folhas por colmo.

- Determinar o melhor substrato a ser utilizado no processo de aclimatização, avaliando a taxa de sobrevivência, crescimento da raiz e desenvolvimento de folhas das plântulas.

3 JUSTIFICATIVAS:

A ação do escoamento superficial da água e do vento em solo descoberto provoca uma grande perda anual de solos cultiváveis, tornando terrenos com alto potencial em áreas improdutivas e menos sustentáveis. Além da erosão, catástrofes naturais desestabilizam solos causando desabamentos e deslizamentos de terra que podem acarretar em perdas valiosas na infra-estrutura de uma propriedade.

Em 1986 o Banco Mundial desenvolveu o Sistema Vetiver como uma maneira sustentável para o controle de erosão e recuperação de áreas degradadas. Esse Sistema, utilizado na Bioengenharia, é baseado na Tecnologia do Capim Verde. Esta técnica consiste no cultivo em fileiras do Vetiver, estes cordões vegetativos atuam como barreiras vivas que recobrem o solo, diminuem o impacto das gotas de chuva, reduzem a velocidade superficial da água e atuam na contenção de sedimentos, formando progressivamente um terraço natural. Em terras instáveis ou erodíveis o SV primeiro reduz a erosão para depois estabilizar o solo, conservando sua umidade e resgatando nutrientes ao longo do perfil; melhorando o micro-clima do local para que outras plantas semeadas ou voluntárias possam estabelecer-se mais tarde. Além dessas características de proteção física do solo a planta possui características morfológicas e fisiológicas únicas especializadas na proteção ambiental, em especial na prevenção e tratamento do solo e água contaminada, podendo ser utilizadas em tratamentos de águas residuais e fitorremediação de solos contaminados.

Por não apresentar sementes férteis ou estolões o Vetiver não se torna invasivo no meio ambiente, podendo ser utilizado em diversos sítios ecológicos. Sua rusticidade torna a planta capaz de sobreviver numa ampla gama de ambientes. Truong et al. (2006) afirmam que o Vetiver é capaz de sobreviver em condições de secas prolongadas, incêndios, inundações, temperaturas extremas (-15°C a +55°C) e quando submetido ao intenso tráfego/pressão de pastoreio, soterramento por sedimentos ou poda severa rapidamente se recompõe emitindo novos perfilhos. Tolerância a solos sódicos, salinos, alcalinos, uma ampla faixa de pH (3.3 a 12.5), altos níveis de saturação de Al, Mn e metais pesados tais como: As, Cd, Cr, Ni, Pb, Hg, Se e Zn. Quando não for mais interessante manter a planta, a pulverização de glifosato (Roundup) ou o corte da planta abaixo da coroa pode eliminá-la do local.

A qualidade do material de plantio é fundamental para o sucesso do SV. A produção desse material requer viveiros capazes de produzir grandes quantidades de mudas de alta qualidade e de baixo custo. Como a reprodução do Vetiver é exclusivamente vegetativa a produção de mudas é realizada principalmente em viveiros mantidos a campo, o que necessita um amplo espaço para o cultivo de plantas matrizes. Uma alternativa para a produção massal de mudas de Vetiver é a cultura de tecidos.

Pode-se afirmar que a capacidade do controle do ambiente, a grande quantidade de material produzido em espaço reduzido, o controle da produção de mudas geneticamente idênticas e livres de contaminantes, são vantagens da cultura de tecidos. Porém, o maior obstáculo na propagação *in vitro* do Vetiver é o custo do investimento inicial e da manutenção de um laboratório; a necessidade de mão-de-obra especializada, elaboração de protocolos específicos para cada variedade e a probabilidade de ocorrência de mutações genéticas também são entraves na cultura de tecidos.

Truong et al. (2006) recomendam o cultivo de mudas de raízes nuas em sacos de polietileno (polybags) quando o local de plantio apresentar condições adversas e hostis. Esta prática facilita o estabelecimento e crescimento pós-plantio das mudas pois tornam as plantas mais resistentes a variação de temperatura e umidade, minimizando o manejo da manutenção. Por outro lado, a produção, o longo período de preparação das mudas e o transporte de grandes volumes das polybags encarecem essa técnica.

Truong, et al. (2006) apresentam um método alternativo, baseado na polybags, para o cultivo do Vetiver. Neste método as plantas são cultivadas bem perto uma da outra em uma longa esteira especial, formando um cordão uniforme, o que aumenta a sobrevivência da planta e facilita o transporte e o plantio em áreas restritas.

Pereira (2006) afirma que o uso do Vetiver para controle da erosão, estabilização de encostas e conservação da água/solo no Brasil ainda é muito restrito, em razão da deficiência de produção de mudas e da pouca informação a respeito das técnicas utilizadas no SV. O mesmo autor ainda afirma que o aumento de conhecimento sobre as funções da planta e da confirmação do sucesso de experimentos realizados nos estados Brasileiros, está abrindo portas para que esta tecnologia seja difundida largamente no Brasil.

Além do controle da erosão, estabilização de encostas e conservação da água/solo, outras funções podem ser atribuídas ao Vetiver: de suas raízes se extrai o óleo essencial utilizado na medicina natural e na fixação de perfumes; suas folhas são utilizadas na alimentação de animais, artesanatos, produção de bicomcombustível e suas cinzas têm alto potencial na substituição do cimento; sua bela inflorescência lilás é apreciada no paisagismo; entre outros. Devido a essas características deve-se estimular o uso do Vetiver na geração de

renda em comunidades de países em desenvolvimento. O mesmo deve ocorrer com uso do SV em áreas em que ocorreram desastres ecológicos, encorajando a participação dos integrantes da comunidade nas etapas do projeto.

O SV é de fácil utilização, baixo custo e, se aplicado corretamente, funciona! Na maioria dos casos, a falha no uso da Tecnologia do Capim Verde é devido à compreensão inadequada ou aplicações incorretas da Técnica, e não ao Sistema em si. No entanto, convém sublinhar que as chaves mais importantes para o sucesso do projeto são: aplicação de técnicas corretas no plantio, um bom material a ser cultivado e a elaboração de um projeto específico para cada área. A divulgação e o estabelecimento do SV podem surtir grande efeito no Estado, visando a prevenção/recuperação de desastres como o que ocorreu no Vale do Itajaí em 2008. Atualmente essa tecnologia é de domínio público e a informação sobre ela é gratuita.

Por todos os motivos acima mencionados deve-se estimular o desenvolvimento de protocolos específicos para micropropagação do Vetiver.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA:

4.1 - Características gerais da planta:

O Vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash), recentemente reclassificado como *Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty, é uma planta perene, cespitosa, ereta com 1,50-2,00 m de altura pertencente à família *Poaceae*. Ela ainda é conhecida como capim-vetiver, capim-verde, capim-de-cheiro, grama-das-índias, falso-patchuli e raiz-de-cheiro, de acordo Correia apud Barros (2008). Possui numerosas raízes, de cor parda escura, fortes, longas e aromáticas. Suas folhas são estreitas e longas, fortes, eretas, mas com a extremidade dobrada, não aromática, mais escura que o colmo, com margens ásperas e cortantes, com lígula curta e escariosa (CASTRO e RAMOS apud BIASI e DESCHAMPS, 2009).

O Vetiver possui quatro espécies do gênero *Chrysopogon* distintas de origem Sul Asiática. No Norte do subcontinente Indiano encontra-se a espécie *C. lawsonii*, silvestre, normalmente diplóide de sementes férteis e sistema radicular escasso. No Sul da Índia existem diversos acessos da espécie *C. zizanioides*, planta domesticada, poliplóide de sementes inférteis e de extenso sistema radicular. A espécie *C. nemoralis* distribuí-se amplamente nas terras bem drenadas da Tailândia, Laos e Vietnam estendendo a Camboja e Mianmar. A espécie *C. nigritana* nativa do Continente Africano tem seu uso restrito ao continente (TRUONG et al., 2006).

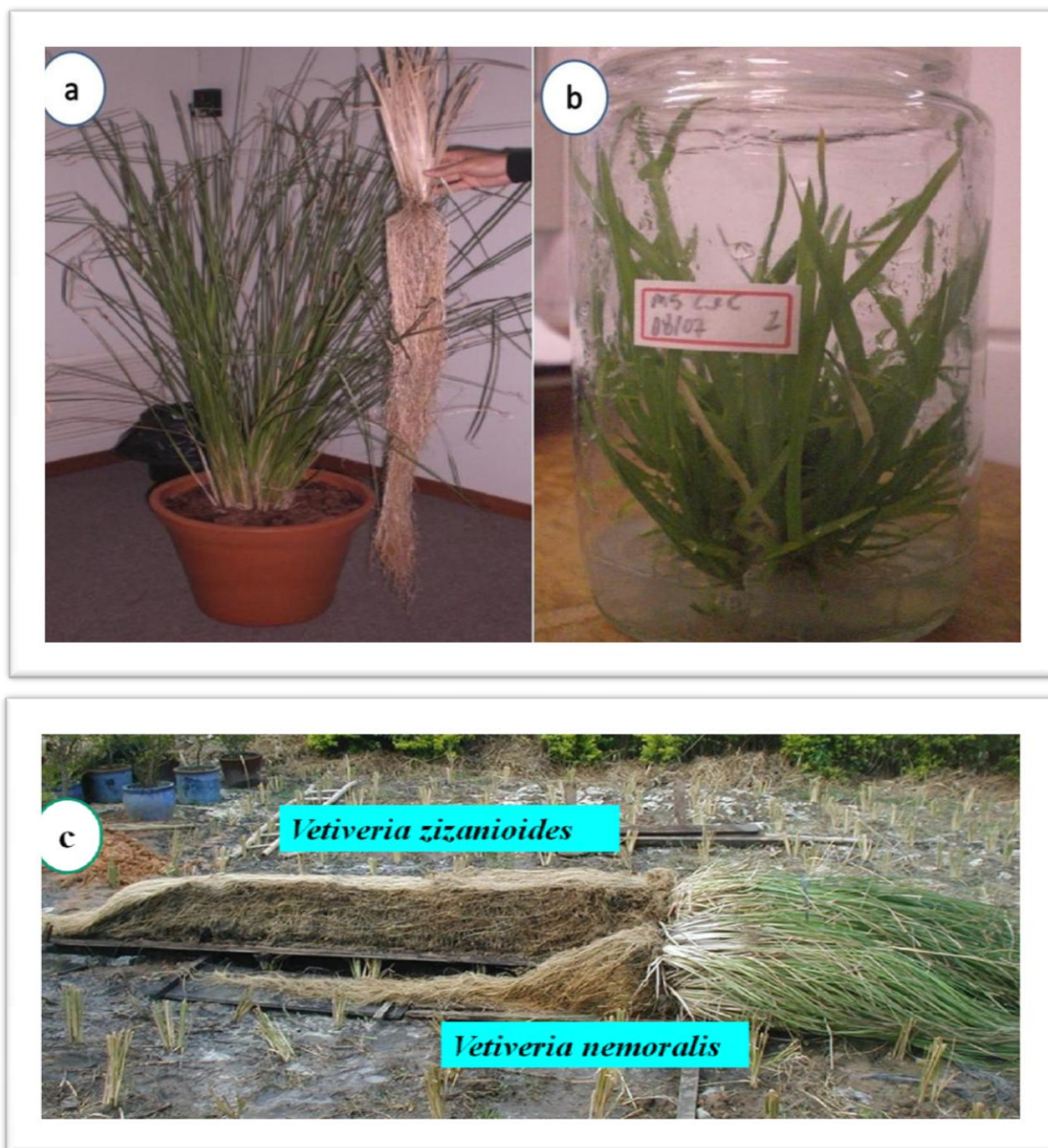


Figura 1: a) planta de Vetiver cultivada em vaso, observar o sistema radicular da planta ao lado com aproximadamente 6 meses de idade; b) gemas desenvolvidas por micropropagadas de Vetiver em meio de cultura suplementado com 2 μ M ANA / 4 μ M BAP (30 dias); c) Relação do crescimento de raízes de *Chrysopogon zizanioides* (L) Roberty e *C. nemoralis* (foto c; adaptado TRUONG, et al. 2006).

Até meados da década de 1980 a utilização do Vetiver praticamente limitava-se a produção do óleo essencial. No decorrer desta década os centros de investigações na Índia realizaram os primeiros projetos de conservação do solo/água utilizando a Tecnologia do Capim Verde (TCV) na Malásia e Tailândia. A TCV é baseada no cultivo em curva de nível do capim Vetiver, formando um cordão vegetativo que reduz intensamente o escoamento

superficial da água e promove a agregação do solo devido ao intenso desenvolvimento horizontal do seu radicular (GRIMSHAW, 2006). Muitos estudos realizados com *C. zizanioides* com *C. nemoralis* comprovaram maior eficiência na conservação do solo da primeira em relação à segunda (**Figura 1-c**).

O Vetiver é conhecido como Capim Milagroso na Ásia por apresentar características morfológicas, fisiologias e ecológicas exclusivas, que o tornam uma planta excelente para conservação do solo e da água. O Vetiver não é considerado uma planta invasora, pois não apresenta sementes férteis ou estolões, sendo pouco invasiva em qualquer sítio ecológico. Sua perpetuação em outras áreas depende do plantio manual/mecânico de mudas (PEREIRA, 2006).

Muitos estudos demonstram que o Vetiver possui uma ampla faixa de adaptação às mais diversas condições edafoclimáticas. A planta sobrevive em condições de secas prolongadas, incêndios, inundações, temperaturas extremas (-15°C a +55°C) e quando submetido ao intenso tráfego/pressão de pastoreio, soterramento por sedimentos ou poda severa rapidamente se recompõem emitindo novos perfilhos. Toleram solos sódicos, salinos, alcalinos, uma ampla faixa de pH (3.3 a 12.5), altos níveis de saturação de Al, Mn e metais pesados tais como: As, Cd, Cr, Ni, Pb, Hg, Se e Zn (TRUONG et al., 2006).

Servindo-se das características acima expostas do Vetiver, o Banco Mundial desenvolveu em 1986 o Sistema Vetiver (SV) como um sistema vegetativo de conservação de água e solo de baixo custo. Atualmente mais de 100 países dos trópicos, semi-trópicos e regiões temperadas utilizam o SV em estabilização de terrenos (ferrovias e rodovias), reabilitação de minas, tratamento de águas residuais e melhoria da qualidade da água (GRIMSHAW, 2006).

4.2 - Sistema Vetiver:

Assim como a água, o solo tem uma grande importância para a humanidade, porém o uso irracional destes limita suas utilizações. Como estes recursos fornecem indiretamente grande parte do que necessitamos, especialmente o alimento, a conservação dos mesmos deve ser encorajada. Diante disso, deve ser realizado um planejamento técnico, acompanhado e fiscalizado pelos órgãos governamentais de todos os países, visando o manejo adequado e sustentável destes meios.

O Banco Mundial desenvolveu em 1986 o Sistema Vetiver (SV) como um sistema vegetativo de conservação de água e solo de baixo custo. Este Sistema é baseado na aplicação

da Tecnologia do Capim Verde (TCV), ou seja, o cultivo em curva de nível do Capim Milagroso (GRIMSHAW, 2006). Segundo Truong et al. (2006) a aplicação dessa Técnica na Bioengenharia consiste no cultivo em fileiras do Vetiver, formando cordões vegetativos que atuam como barreiras vivas que recobrem o solo, diminuindo a ação do impacto da gota da chuva, reduzindo a velocidade superficial da água, conservando sua umidade, resgatando nutrientes ao longo do perfil e melhorando o micro-clima; estimulando o estabelecimento de outras plantas semeadas ou voluntárias no local. Além do mais as características morfológicas e fisiológicas únicas da espécie tornam o Vetiver uma excelente planta a ser empregada na proteção ambiental, em especial na prevenção e tratamento do solo e da água contaminada, podendo ser utilizadas em tratamentos de águas residuais e fitorremediação de solos contaminados.

O SV foi implantado com sucesso em muitos países do mundo, incluindo Austrália, Brasil, China, Etiópia, Índia, Itália, Malásia, Nepal, Filipinas, África do Sul, Sri Lanka, Tailândia, Venezuela e Vietnã (TRUONG et al., 2006).

4.2.1 - Conservação do solo e de sua umidade:

Segundo Grimshaw (2006), para que uma planta possa ser utilizada na Bioengenharia e não ser invasiva deve apresentar as seguintes características: suas sementes devem ser estéreis e a planta não deve apresentar estolões, de modo não se tornar invasora; seja resistente ao fogo, pisoteio e pastoreio. Deve ainda ser uma planta perene e permanente, formar perfilhos densos que permitam minimizar o efeito erosivo das águas de enxurradas e possuir características das plantas xerófilas e hidrófilas. O sistema radicular deve ser vertical e profundo e capaz de se desenvolver em solos não favoráveis, independentemente do nível de nutrientes, pH, sodicidade, salinidade e minerais tóxicos. Quando soterrada, a planta deve ter capacidade de rebrotar ao mesmo nível do sedimento, não competir com a cultura que está protegendo, ser resistente a pragas e doenças, crescer em uma ampla variedade de climas, suportar temperaturas extremas (-15 ° C a mais de 55 ° C), longas estiagens (>6 meses) até precipitações entre 300 mm - 6.000 mm. Quando não mais necessária deve ser de fácil remoção e a implantação e manutenção do projeto deverá ser de fácil execução e de baixo custo econômico. Todas essas características podem ser encontradas no Capim Milagroso.

O objetivo da prática de conservação do solo é controlar ou reduzir a erosão do solo causada pela água e pelo vento. No caso da erosão hídrica, as partículas do solo são primeiramente fragmentadas pelo impacto da gota da chuva e então carregadas pelo volume

excessivo e/ou alta velocidade do escoamento superficial da água e a erosão eólica é o resultado da alta velocidade do vento ao nível do solo na superfície nua (PEREIRA, 2006).

O controle da erosão hídrica visa proteger a superfície do solo do impacto das gotas de chuva, reduzir a velocidade de escoamento superficial através da cobertura vegetal e proporcionar a infiltração da água no perfil do solo. A cobertura vegetal também protege o solo nu das ações da erosão eólica (PEREIRA, 2006).

Os espessos e firmes colmos do Vetiver formam uma densa cobertura que reduz a velocidade de escoamento superficial da água, armazenando os sedimentos e permitindo a infiltração da água no perfil do solo. Os sedimentos que se espalham por trás da barreira gradualmente se acumulam para formar um terraço de longa duração com a proteção de Vetiver. Uma boa cobertura de plantas reduzirá o fluxo da água em 70% e sedimentos em até 90% (TRUONG, et al., 2006).

Seu forte sistema de raízes é incomparável com qualquer outra planta utilizada para o controle de erosão e estabilização de encostas. A força e vigor de suas raízes permitem sua penetração em solos compactados, consolidando e estabilizando a estrutura do mesmo (PEREIRA, 2006). Truong, et al. (2006) afirmam que suas raízes possuem uma força de tração média testada de cerca de 75 Mega Pascal, que é equivalente a 1/6 do reforço de aço leve, e um incremento de resistência ao cisalhamento de 39% em uma profundidade de 0,5 m.

O profundo sistema de raízes do Vetiver cresce rapidamente e, dependendo das condições, pode atingir até dois metros no primeiro ano. Esta característica torna a planta tolerante a épocas de estiagem e eficaz na recuperação de nutrientes solúveis nas mais profundas camadas do perfil do solo; estes nutrientes são reciclados quando a planta é utilizada na cobertura do solo ou no composto de suas folhas (PEREIRA, 2006).

Além da erosão do solo, o Sistema Vetiver pode prevenir ou reabilitar áreas onde ocorreram desastres naturais, atuando na contenção e estabilização de encostas. Muitos estudos já foram realizados na recuperação de áreas degradadas por deslizamentos de terra em estradas e ferrovias, margens de rios, represas, cursos d'água, dunas, proteção de árvores frutíferas ou de madeira, diques, rupturas em barragens e pontes. Aplicando técnicas e metodologias corretas pode-se reduzir ou eliminar a incidência de deslizamentos, protegendo a infra-estrutura do terreno (TRUONG, et al., 2006).

De modo geral a cobertura do terreno com Capim Vetiver é estabelecida através da plantação de mudas com três brotos, espaçadas cerca de 10-15 cm de distância e intervalo entre linhas de contorno variando de 1-2 m dependendo do clima, declividade do terreno e do tipo do solo. A época do plantio é um fator importante para o cultivo do Vetiver, deve ser preferencialmente realizada na época das chuvas ou com irrigação suplementar. Apesar de

exigir pouca manutenção, o controle das ervas daninhas até o estabelecimento das plantas é necessário, pois o crescimento do Vetiver é favorecido pela incidência solar sobre a planta; existem relatos de Sistemas que foram suprimidos devido ao intenso desenvolvimento de plantas concorrentes. O uso do herbicida a base da molécula de glifosato de amônio deve ser evitado, pois o Vetiver é muito sensível a este composto. O replantio de mudas se faz necessário quando, eventualmente, algumas plantas do cordão vegetativo morrem, assegurando a eficiência do Sistema. Em terras instáveis ou erodíveis, Vetiver primeiro reduz a erosão, estabiliza o solo, em seguida, por causa do resgate de nutrientes e conservação da umidade, melhora o microambiente possibilitando o estabelecimento de plantas semeadas ou voluntárias (TRUONG, et al., 2006).

Muitos trabalhos foram realizados na recuperação de encostas erodidas, Truong, et al. (2006) cita os exemplos na Austrália, China, Madagascar, Vietnam e Tailândia. Apesar de ser pouco difundido no Brasil o SV já foi implantado em Pomerode/SC, nas margens do Rio São Francisco/SE (GONÇALVES, et al., 2007) e em Petrópolis/ RJ (HENRIQUE, 2010).

Truong, et al. (2006) cita como uma das vantagens do SV seu baixo custo de implantação quando usado com obras de proteção civil, em média 30% dos custos dos tradicionais sistemas de engenharia. Para a estabilização das encostas na China, por exemplo, as economias são da ordem dos 85-90%. Na Austrália, a economia do SV sobre os métodos de engenharia convencional varia entre 64%- 72%, dependendo do método utilizado.

Experimentos demonstram que o uso do SV, combinado com outras técnicas de conservação do solo, tem-se revelado muito eficaz e de baixo custo na Bioengenharia. No entanto, convém sublinhar que as chaves mais importantes para o sucesso do projeto são: aplicação de técnicas corretas no plantio, um bom material a ser cultivado e a elaboração de um projeto específico para cada área (ORIHUELA, 2007).

4.2.2 - Prevenção e tratamentos de áreas contaminadas:

O Sistema Vetiver além de ser aplicado na estabilização e contenção de encostas degradadas pode ser empregado na prevenção e tratamento de solos/águas contaminadas por excesso de nutrientes, metais pesados e pesticidas (PEREIRA, 2006).

A eficiência, simplicidade e o baixo custo tornam o SV um potencial agente na utilização de plantas de Vetiver como filtro biológico, suavizando os impactos de metais pesados bem como poluentes orgânicos e inorgânicos. Diversos países utilizam esse Sistema no tratamento de efluentes industriais e domésticos, no controle de lixiviação em aterros

sanitários, na remoção de nutrientes em corpos hídricos eutrofizados, reabilitação de áreas de mineração e fitorremediação de solos contaminados; mitigando o perigo da contaminação do lençol freático (TRUONG, et al., 2006).

A eficiência do Vetiver no tratamento da água contaminada reside na sua capacidade de absorver rapidamente os nutrientes e metais pesados, e da tolerância a níveis elevados destes elementos. Embora as concentrações destes elementos em plantas de Vetiver não sejam tão elevadas como de plantas hiper-acumuladores, seu crescimento rápido e alto rendimento de biomassa permitem ao Vetiver remover um volume muito maior de nutrientes e metais pesados de terras contaminadas que a maioria dos hiper-acumuladores (TRUONG, et al., 2006).

Experimentos realizados em estufas sob condições ideais quantificaram o consumo de água do Vetiver, estima-se que para 1 kg de matéria seca o uso de 6.86 l/dia. Uma vez que a biomassa de Vetiver de 12 semanas de idade é de aproximadamente 30,7 t.ha⁻¹, um hectare de Vetiver potencialmente usaria 279 l/ha/dia (TRUONG e SMEAL apud TRUONG et al., 2006).

O Vetiver tem a capacidade de captação e retenção de metais pesados da seguinte forma: Zn > Cu > As > N > Pb > Hg, além dos macronutrientes N e P (LIAO et al. apud TRUONG et al., 2006). Estudos realizados indicam que o Vetiver mostrou-se eficaz na retenção de herbicidas, como diuron, trifluralina, prometrina e fluometurão; e pesticidas, como endosulfan, sulfato de endosulfan e clorpirifos, paration, e profenofos (TRUONG, et al., 2006).

Em Queensland/AU utilizações práticas do SV no tratamento de águas residuais industriais em uma fábrica de processamento de alimentos e um matadouro bovino foram mencionadas (SMEAL et al. apud TRUONG et al., 2006). No Sul do Vietnã, um ensaio de demonstração foi elaborado em uma fábrica de processamento de frutos do mar, os níveis de nitrato foram reduzidos em 90% em 72 horas enquanto os níveis de fosfato reduzidos 82% em 72 horas (LUU et al. apud TRUONG et al, 2006). Os autores ainda citam o tratamento de efluentes de uma pequena fábrica de papel e uma pequena fábrica de fertilizantes de nitrogênio no Norte do Vietnã. Na China, os nutrientes e metais pesados das criações de suínos são as principais fontes de poluição da água, principalmente por N, P, Cu e Zn e a irrigação do Vetiver com esterco líquido mostrou-se muito eficiente para neutralizar esses compostos, além de outros como As e Pb.

Dadas as suas extraordinárias características o Vetiver tem sido usado com sucesso para a reabilitação de minas e fitorremediação de seus rejeitos, Truong et al. (2006) cita casos em minas de carvão, ouro, bauxita e bentonita na Austrália, em minas de ouro, diamante e

platina na África do Sul, minas de Chumbo na Tailândia, minas de níquel e bauxita na Venezuela e minas de chumbo e bauxita na China.

As folhas e raízes que foram utilizados na descontaminação de águas residuais podem ser usadas na fabricação de cerâmicas e suas cinzas podem ser convertidas em cimento (ORIHUELA, 2007).

Analisando as características acima descritas pode-se considerar o SV como uma alternativa viável e possível na reabilitação de áreas degradadas e tratamento de águas residuais.

4.2.3 - Vantagens e desvantagens do Sistema Vetiver:

Truong, et al. (2006) comentam as vantagens e desvantagens do Sistema Vetiver para recuperação de áreas degradadas.

-VANTAGENS:

- A grande vantagem do SV é seu baixo custo de implantação e sua longevidade quando comparado com métodos da engenharia convencional.
- Os custos de manutenção a longo prazo são baixos, é necessário um programa de manutenção planejada nos primeiros dois anos, no entanto, uma vez estabelecido, é virtualmente livre de manutenção. Diferente das estruturas convencionais de engenharia, sua estrutura melhora com o amadurecimento da cobertura vegetal.
- O SV é um sistema natural, ambientalmente amigável para o controle da erosão e estabilização de encostas, uma alternativa ecológica para medidas rígidas da engenharia convencional, tais como estruturas de concreto e pedra.
- O Vetiver é muito eficaz em solos pobres, altamente erodíveis e dispersíveis

-DESVANTAGENS:

- O Vetiver é intolerante ao sombreamento, em particular na fase de estabelecimento.
- O SV só é eficaz quando as plantas estiverem bem estabelecidas. O período de estabelecimento inicial em clima quente é cerca de 2-3 meses enquanto em climas frio próximo de 4-6 meses.
- As plantas Vetiver só são plenamente eficazes quando cultivadas em alta densidade.

- É difícil plantar e irrigar a vegetação em lugares muito altos ou em despenhadeiros nas encostas.
- Vetiver requer proteção contra o gado durante a sua fase de estabelecimento

Com base nestas considerações, as vantagens do uso de SV como uma ferramenta de Bioengenharia superam as suas desvantagens.

4.3 - Outras utilidades:

Além do uso do Vetiver na conservação do solo/água, outros usos/utilidades potenciais podem ser considerados. Chomchalow e Nanakor (2003) diferenciam o uso e a utilidade do Vetiver; o uso é definido quanto ao uso direto da planta, enquanto a utilização refere-se ao uso das partes colhidas.

As folhas do Vetiver podem ser utilizadas na alimentação de animais, dentre eles a carpa-capim, cavalos, ovelhas e gado (Truong et al., 2006). É recomendada a utilização das folhas mais jovens pois as folhas maduras têm alto teor de sílica e apresentam baixo valor nutritivo. As folhas apresentam quantidades insignificantes de substâncias tóxicas, podendo ser administradas ao gado no inverno, especialmente se combinado com forragem de alta proteína (PANICHPOL et al. 1996 apud. CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003). Alguns acessos são conhecidos por serem mais palatáveis, sendo a cultivar Karnataka selecionada pelos agricultores ao longo de décadas para essa finalidade. No Texas (EUA) sob condições de irrigação, a produção de matéria seca é próxima de 100 toneladas por hectare/ano, equivalente a 350 toneladas de folhas frescas. (GRIMSHAW, 2006).

O composto produzido com folhas e colmos de Vetiver é rico em nutrientes, de consistência macia e de cor escura. Em países tropicais com alta pluviosidade sua palha serve de cobertura vegetal mantendo as plantas daninhas sob controle e devido suas características repelentes contribui com a dispersão de alguns insetos maléficos (CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003).

Techapinyawat apud Chomchalow e Nanakor (2003) relata que certas substâncias excretadas pela planta inibem o crescimento de outras plantas. O mesmo observou que extratos de caule e raiz apresentavam efeitos alelopáticos negativos na germinação de sementes de soja, e ainda sugeriu a aplicação do extrato no controle de ervas daninhas evitando assim o uso de herbicidas químicos. São relatados ainda efeitos fungicidas (GREENFIEL apud CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003) e acaricidas (KORPRADITKUL apud CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003)

O Vetiver quando cultivado nas bordaduras das culturas do milho e arroz reduz o aparecimento de brocas do caule, sendo observada preferência das mariposas em ovopositar nas folhas do Vetiver (TRUONG et al., 2006). Levy apud Chomchalow e Nanakor (2003) também observou a parcial inibição da broca da cana de açúcar quando o Vetiver é plantado na bordadura da cultura.

Há mais de três mil anos em grande parte da Ásia seu óleo é empregado na perfumaria e na medicina fitoterápica (PEREIRA, 2006). O óleo possui efeitos sedativos e de fortalecimento do sistema nervoso atuando em doenças relacionadas ao estresse. Seu uso estimula o sistema circulatório aumentando a produção de células vermelhas do sangue e é, portanto, benéfico para a anemia e cicatrização de feridas. A fricção com o óleo é também recomendada para dores musculares, entorses, rigidez, reumatismo e artrite (CHOMCHALOW, 2001). Na área da perfumaria o óleo é utilizado como fixador de perfumes, pois serve de base para outras fragrâncias que se aderem ao Vetiverol. (TRUONG et al., 2006)

As folhagens de Vetiver são utilizadas em diversas áreas da construção rural. Os Tailandeses, bem como outras populações rurais na Ásia, há muitos anos vem utilizando seus colmos e folhas de Vetiver no telhado de sua residência. As folhas de Vetiver são revestidas com cera e tem um perfume original que repele o ataque de insetos e fungos (CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003). As folhas do *C. nigriflora* são utilizadas na construção de cabanas no Continente Africano (JULIARD apud CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003).

Vários estudos realizados comprovaram a eficácia do Vetiver na construção civil. Fibras de Vetiver são utilizadas na fabricação de blocos de argila, uma vez que diminuem as rachaduras e a possuem baixa condutividade térmica, promovendo economia de energia e melhorando o conforto em casas construídas com esses blocos (PEREIRA, 2006). Outros estudos mostraram que as cinzas do Vetiver têm características pozolânicas e podem ser utilizadas como argamassa em construções, substituindo o cimento em áreas rurais de países em desenvolvimento (NIMITYONGSKUL apud CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003).

Em situações ideais de cultivo, o Vetiver representa um forte potencial de fonte de energia. Kuhirun e Punnapayak apud Chomchalow e Nanakor (2003), descreveram o processo de produção de etanol a partir de folhas de Vetiver. Após o pré tratamento alcalino as folhas de Vetiver foram adicionadas ao mosto (pH 5,0) a levedura (*Trichoderma reesei*) e posterior fermentação; após 7 dias mantidos a 40° C a produção de etanol foi de 13% após um ciclo de destilação.

Por apresentar alto teor de hemicelulose e celulose (45,8%) o Vetiver pode ser usado como matéria-prima na fabricação do papel e aproximadamente 35% de fibras de Vetiver podem ser adicionadas na composição do papel, com ótimos resultados para papéis de impressão e escrita. Por apresentar diversos compostos químicos as folhas de Vetiver são utilizadas como substrato no cultivo de cogumelos (CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003).

O Vetiver maduro possui uma inflorescência lilás muito bonita, podendo ser utilizada em áreas abertas com finalidade paisagística ou na confecção de arranjos florais (PEREIRA, 2006). Suas raízes possuem aromas e são utilizadas para odorizar ambientes. Suas fibras são utilizadas no enchimento de colchões e travesseiro e na produção de artesanatos como tapetes, cestas, persianas e vasos de barro (CHOMCHALOW e NANAKOR, 2003).

4.4 – Propagação do Vetiver:

Como a maioria das aplicações do Sistema Vetiver requer um grande número de plantas, é necessário existir viveiros de mudas capazes de produzir grandes quantidades de mudas de alta qualidade e baixo custo. Como o Vetiver possui sementes estéreis, sua propagação é exclusivamente vegetativa (TRUONG, 2006). A propagação vegetativa resulta em indivíduos com a mesma constituição genética da planta-mãe (HEICHHORN et al., 2006) e assim as condições ambientais são extremamente importantes para o desenvolvimento dos vegetais no viveiro.

Para garantir sucesso no estabelecimento da produção devem ser levadas em consideração as técnicas de cultivo e colheita, treinamento operacional do pessoal e condições edafoclimáticas. A forma mais comum de se propagar mudas de Vetiver é realizando o plantio das partes maduras de touceiras da planta-mãe, tais como mudas de raízes nuas, coroa e colmos. (TRUONG, 2006).

Le Van Be apud Truong (2006) desenvolveu um método de quatro etapas para multiplicação de mudas de Vetiver: 1) A partir de uma planta-mãe retirar mudas contendo pelo menos dois ou três brotos e uma parte da coroa (rizoma). As mudas separadas devem ser cortadas a 20 cm de comprimento e suas raízes podadas. 2) Pulverizar as mudas com 10% de solução de aguapé. Esta solução contém reguladores de crescimento (auxinas e giberelinas) que estimulam o enraizamento de novos brotos mais vigorosos. 3) Manter as mudas em condições úmida e escura por 24 horas. 4) Mergulhar na lama de argila ou na lama de esterco (estrume) e plantar no viveiro.

Os solos preferenciais para o cultivo são os franco-arenosos e areno-argilosos, pois facilitam o crescimento do sistema radicular da planta. Antes do plantio recomenda-se

interpretar a análise de solo e corrigir a acidez, elevar a taxa de saturação de bases para 60% e, se necessário, aplicar 10 kg.ha⁻¹ de N, 20-60 kg.ha⁻¹ de P₂O₅, 20-40 kg.ha⁻¹ de K₂O. Após um mês aplicar 30 kg.ha⁻¹ de N (BIASI e DESCHAMPS, 2009). O clima ideal para o desenvolvimento do vegetal deve ser quente, chuvoso e ensolarado, Dudai et al. apud Biasi e Deschamps (2009) complementam que o número de perfilhos é influenciado pelo aumento da temperatura do ar e não pelo comprimento do dia.

O espaçamento aconselhado para o cultivo, visando produção de mudas, é de 1,00 m entre linhas e 1,00 m entre plantas, o que pode variar dependendo das condições de manejo e disponibilidade de mudas. Recomenda-se que, após quatro meses do plantio, cortar a touceira a 30 cm do solo, antes do desenvolvimento das inflorescências. Este trato mantém a uniformidade das novas plantas com as antigas e favorece o desenvolvimento de 30 novos brotos em média. Aplicando esses tratos culturais o número de brotos adquiridos em um ano é aproximadamente de 600.000 brotos. Quando houver necessidade de obtenção de novas mudas o último corte da touceira deve ser feito com ajuda de uma pá e facão para retirar a planta com partes da raiz (ORIHUELA, 2007).

As mudas de raízes nuas podem ser cultivadas em sacos de polietileno (polybags) para recuperação do solo, facilitando o plantio nessas áreas que normalmente apresentam condições hostis. Segundo Pinto et al. (2010) as mudas de Vetiver produzidas em saquinhos de polietileno apresentaram taxa de sobrevivência no campo superior àquelas plantadas diretamente no campo (raízes nuas), sendo que a taxa de sobrevivência das mudas de Vetiver não é influenciada pelo espaçamento de plantio. O espaçamento entre plantas e entre linhas depende das condições de relevo do local aonde será cultivado. Outro método relatado por Truong et al. (2006) para facilitar o cultivo do Vetiver no plantio em faixas é uma forma modificada de polybags, neste as plantas são cultivadas bem perto uma da outra em uma longa esteira especial que facilitará o transporte e o plantio.

A multiplicação de gemas *in vitro* é uma técnica utilizada na cultura de tecidos para multiplicação em larga escala e em condições controladas de crescimento (TRUONG et al., 2006). Vãn Ây e Vãn Hòa (2007) afirmam que a partir de uma gema de Vetiver podem ser formados 42 bilhões de gemas em um ano pelo método de imersão temporária.

4.5 - Biotecnologia:

A Biotecnologia compreende, em seu sentido mais amplo, a manipulação de microorganismos, plantas e animais, com o objetivo de obter os processos e produtos de

interesse, empregando técnicas modernas de biologia molecular e celular (GUERRA e NODARI, 2006).

A Biotecnologia vem se desenvolvendo a milhares de anos. Quatro mil anos a.C. a fermentação para fabricação de pães e cervejas já era realizada no Egito, queijos e vinhos já eram fabricados na China e até técnicas de inseminação artificial em cavalos de raças superiores já era efetuada em 1.322 d.C na Arábia (FELDBAUM, 2004).

Apartir da década de 50, principalmente na de 80, a velocidade com que as descobertas e os avanços científicos ocorreram contribuíram para que o termo Biotecnologia se desenvolve-se. Atualmente diversos setores utilizam técnicas da Biotecnologia, podemos citar: agropecuária, têxtil, ambiental, energético, médico-farmacêutico, alimentício, veterinário, químico, entre outros (NEI, et al., 2008).

Uma técnica da Biotecnologia, com grande potencial para a multiplicação de plantas, é a cultura de tecidos.

4.5.1 - Cultura de Tecidos:

Andrade (2002) se refere a cultura de tecidos vegetais como uma ferramenta da biotecnologia com alto potencial para multiplicação de plantas. O mesmo autor ainda relata outras finalidades para a cultura de tecido tais como o intercâmbio e avaliação de germoplasma, produção de mudas livres de vírus, aumento da variabilidade genética mediante a produção de variantes somaclonais, fase essencial para obtenção de plantas transgênicas, no melhoramento vegetal, entre outros.

A propagação vegetativa *in vitro* é a aplicação mais prática da cultura de tecidos e vem sendo utilizada para clonar massivamente plantas em escala comercial. Na técnica de micropropagação explantes são isolados da planta matriz, desinfestados e cultivados em condições assépticas em um meio de cultura apropriado. Os principais explantes utilizados na micropropagação são os meristemas, ápices caulinares, segmentos nodais, embriões, entre outros (ANDRADE, 2002).

A totipotencialidade, capacidade de cada célula possuir o potencial de regenerar-se em outra planta adulta (HEICHORN et al., 2006), é uma característica intrínseca dos vegetais e permite o cultivo *in vitro* dos mesmos. Na micropropagação podemos observar duas rotas morfogenéticas para o desenvolvimento dos explantes: a embriogênese somática e a organogênese, nesta os órgãos vegetais são induzidos enquanto naquela são formados embriões a partir de células somáticas. Estas duas vias podem passar por rotas morfogenéticas

distintas, a indireta e direta. Na primeira, tem-se a formação de órgãos/embriões diretamente, sem a passagem por fases intermediárias; enquanto que, na segunda, passa-se obrigatoriamente pela fase de calo (MANTELL et al. apud ANDRADE 2002). O calo é uma massa de células com crescimento desordenado que pode apresentar certo grau de diferenciação (TORRES et al. apud ANDRADE 2002)

Murashige apud Torres et al. (1998) apresenta o conceito de três estágios de desenvolvimento no processo de propagação *in vitro*. O Estágio I, é a seleção de explantes, desinfestação e cultura em meio nutritivo sob condições assépticas em meio para multiplicação; Estágio II, multiplicação dos propágulos mediante sucessivas subculturas; Estágio III, transferência para meio enraizante e transplântio das plantas obtidas para substrato ou solo; alguns autores citam o Estágio 0, sendo correspondente ao tratamento dado à planta matriz, da qual será retirado o explante.

4.5.5.1 - Laboratório de Cultura de Tecidos de plantas:

Cid (2001) afirma que as atividades de cultura de tecidos devem ser realizadas em ambiente asséptico e com temperatura e iluminação controladas, procurando proporcionar ótimas condições ambientais para melhor crescimento e desenvolvimento do material *in vitro*. Neste contexto, instalações com características apropriadas, bem como equipamentos e normas de trabalho devem ser consideradas para manter um elevado nível de assepsia. As atividades desenvolvidas dentro de um laboratório de cultura de tecidos devem ser agrupadas da seguinte forma: limpeza e esterilização, preparo de material e meios de cultura, manipulação asséptica e incubação das culturas.

As atividades anteriormente citadas devem ser realizadas em salas componentes do laboratório tais como: sala de limpeza, de preparo, de transferência do material vegetal, de cultura, almoxarifado e instalações de apoio para adaptar e manter as mudas até sua comercialização como casas de vegetação, câmara de nebulização e telado (TORRES, et al., 1998).

Equipamentos indispensáveis para o funcionamento do laboratório são: autoclave, destilador, deionizador, forno de microondas, estufa de secagem, refrigerador doméstico, freezer, balança de precisão, medidor de pH, agitador magnético, capela de fluxo laminar, frascos de cultura, frascos para reagentes e água, bandeja, vidraria de laboratório, local específico para descarte do material, entre outros (TORRES, et al., 1998).

4.5.5.2 - Metodologia geral da Micropropagação:

O sucesso de uma metodologia para micropropagação depende do controle de um grande número de variáveis, inclusive da espécie da planta a ser propagada, a fonte de explantes e a condição do meio de cultura. A proposta da micropropagação é produzir um grande número de plantas a um custo baixo. São utilizados protocolos específicos para obtenção de bons resultados, geralmente seguindo estágios pré-determinados na realização pra micropropagação (ANDRADE, 2002)

Cid (2001) afirma que o início da micropropagação ocorre com a seleção de explantes adequados e termina com a obtenção de uma cultura livre de contaminantes visíveis e adaptadas a condições *in vitro* para seguinte multiplicação.

O estado fisiológico da planta-matriz, de onde serão retirados os explantes, tem influência direta no comportamento das culturas. Para obter explantes de boa qualidade deve-se assegurar o bom estado fisiológico (nutricional e hídrico) e fitossanitário do vegetal, o que influencia diretamente na contaminação durante o isolamento. A manutenção da planta matriz em casas de vegetação permite o controle e manipulação do fotoperíodo, da intensidade luminosa e da temperatura, estimulando novas brotações e evitando sua exposição às intempéries encontradas em campo (TORRES, et al., 1998).

Segundo Torres et al. (1998) antes da seleção de explantes, o material coletado deve ser lavado em água corrente para lavagem superficial de fontes de contaminação. Em seguida, o material sofre uma primeira toaleta, retirando o excesso de folhas e o caule das brotações. Dependendo da finalidade do explante pode-se utilizar um estéreomicroscópio para ser podado no tamanho desejado.

Na seleção de explantes diversas regiões da planta podem ser utilizadas para iniciar a micropropagação, considerando aspectos como o nível de diferenciação dos tecidos e a finalidade da micropropagação. Teoricamente, devido à totipotencialidade, toda célula vegetal teria condições virtuais de gerar outra planta, porém os tecidos meristemáticos têm maior capacidade para expressar essa característica, sendo os mais utilizados na micropropagação (TORRES, et al., 1998).

O processo de desinfestação deve ser realizado em capela de fluxo laminar sob condições assépticas e os materiais devem ser previamente esterilizados, evitando o processo de contaminação. Várias substâncias com ação germicidas são utilizadas para realizar a desinfestação dos explantes, sendo comuns o etanol (70%) e compostos a base de cloro, como o hipoclorito de sódio. Gotas de detergente (Tween 20) são comumente adicionadas às soluções de cloro, para aumentar a área de contato específica com os tecidos. As

concentrações das soluções desinfestantes e o tempo de imersão podem variar em função da sensibilidade do tecido a ser desinfestado. Após a desinfestação segue a lavagem com água destilada e autoclavada e então a inoculação em meio de cultura estéril (TORRES, et al., 1998).

Na etapa de desinfestação das gemas de Vetiver, Gámez et al. (2008), desinfestaram os explantes de Vetiver com álcool 70% por 15 minutos, Oxochem ® 0,6 % (ácido peracético 6%; H₂O₂, inertes e água desmineralizada c.s.p 94%), adicionando 3 gotas de detergente 'Tween' por 15 minutos. Os autores relataram alta taxa de contaminação do material quando eram utilizadas gemas laterais do colmo, enquanto gemas basais apresentaram baixa taxa de contaminação.

Após a inoculação, as culturas devem ser mantidas em sala de crescimento com condições ambientais estáveis. A sala de crescimento mantém o ambiente em condições na qual a maior parte das culturas cresce normalmente. A temperatura deve ser ajustada entre 20-27°C, o fotoperíodo tende à dias longos (16 horas de luz e 8 de escuro) e a intensidade luminosa varia entre 20 a 70 mmol.m⁻².s⁻¹ (TORRES, et al., 1998).

Van Be, et al. (2008), afirmam que é possível manter plantas micropropagadas, nas fases de multiplicação e enraizamento *in vitro*, em condições naturais de temperatura luminosidade e obter uma redução de gastos de aproximadamente 22%. Porém, o experimento foi conduzido no Sul do Vietnã, região tropical, local com alta incidência solar e sem grandes variações de temperatura. Eventualmente essa técnica pode ser aplicada em algumas regiões subtropicais, porém devem-se levar em conta diversos fatores, incluindo os fatores ambientais, para o sucesso da micropropagação conduzida em viveiros.

A fase de multiplicação tem como objetivo principal produzir um grande e homogêneo número de plantas no menor tempo possível. Após a fase de crescimento e multiplicação exponencial o explante inicia um processo de senescência devido diversos tipos de estresse tais como a deficiência nutricional, acúmulo de gases, falta de água, barreiras físicas ao crescimento (tampas e paredes do frasco). A frequência ideal de subcultura deve coincidir com a fase de crescimento ativo das partes aéreas, aliando o máximo vigor de crescimento com a máxima taxa de multiplicação, comumente em um intervalo de 4 semanas (TORRES, et al., 1998).

Torres et al. (1998) ainda cita uma etapa de enraizamento *in vitro* e aponta que do ponto de vista econômico é desnecessária dependendo da espécie. A etapa final envolve a transferência da planta da condição *in vitro* para casa de vegetação (*ex vitro*), onde é submetida a aclimatização. Esta etapa é crítica para o processo, pois a planta passa por uma série de transformações fisiológicas e mudanças ambientais tais como: mudança para um

ambiente não asséptico com diversos microrganismos, aumento na taxa de transpiração, ausência de suprimento externo de energia para condição autotrófica, necessidade de absorção de sais em ambiente com baixa disponibilidade dos mesmos; algumas plantas necessitando de preparações especiais para o transplântio definitivo.

No transplântio o estresse hídrico das plantas é geralmente o maior entrave na micropropagação pois as plântulas nas condições *in vitro* não apresentam estômatos funcionais, têm pouca cutina e a conexão entre o sistema vascular do caule e das raízes adventícias ainda são precários. Para manter uma alta umidade relativa na casa de vegetação normalmente é utilizado o sistema de nebulização automático. As plântulas são normalmente transplantadas em bandejas de isopor com um substrato que tenha boa retenção de umidade e de pouca compactação. Os substratos comumente utilizados são a vermiculita, perlita, turfa, areia, casca de arroz carbonizada, espuma fenólica e preparados comerciais. O objetivo de todas essas etapas está no sucesso do desenvolvimento deste material em campo (TORRES et al., 1998).

4.5.5.3 - Meio de cultura:

Os meios nutritivos utilizados para a cultura de órgãos, tecidos e células de plantas fornecem as substâncias essenciais para o desenvolvimento dos tecidos, e podem controlar o padrão de desenvolvimento *in vitro*. Desde o início do desenvolvimento dos meios nutritivos procuram-se estabelecer meios definidos e de composição conhecida e controlada para o cultivo *in vitro* de determinada planta (CID, 2001).

O elemento em maior abundância no meio de cultura é a água, e como é uma fonte potencial de impureza recomenda-se utilizar água destilada e deionizada para preparação do meio. Sais inorgânicos também são adicionados ao meio, macronutrientes tais como o ferro, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre e algumas formas de nitrogênio. Dentre os micronutrientes mais utilizados podemos citar o manganês, zinco, boro, cobre, cloro, molibdênio, cobalto e iodo (TORRES et al., 1998).

Como os materiais cultivados *in vitro* não encontram condições adequadas para realizar a fotossíntese e portanto não conseguem sintetizar seu próprio açúcar, a adição de carboidratos ao meio nutritivo é essencial. A sacarose é a forma de açúcar mais utilizada pois a maioria das espécies apresentam alta taxa de crescimento e desenvolvimento quando o complemento está no meio (CID, 2001).

As vitaminas desempenham papel importante nas funções essenciais da planta. Misturas básicas de vitaminas desenvolvidas pelos primeiros pesquisadores ainda são utilizadas até hoje, podemos citar as formulações das vitaminas de MS e as vitaminas de Morel. As principais vitaminas utilizadas são a tiamina, ácido nicotínico, piridoxina, pantotenato de Ca, mio-inositol e glicina (TORRES, et al., 1998).

A composição e concentração de hormônios no meio nutritivo são fatores determinantes no crescimento e no padrão de desenvolvimento em grande parte dos sistemas de cultura de tecidos. As auxinas e citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas na cultura de tecidos, a interação e a disponibilidade dessas classes de reguladores regulam a formação de raiz, parte aérea e calo nas culturas. Outros reguladores também são utilizados com menos frequência podemos citar as giberelinas, ácido abscísico, etileno, entre outros (CID, 2002).

Os meios nutritivos podem ser de consistência líquida ou sólida dependendo da espécie a ser micropropagada e das condições de cultivo. Além do preparo do meio de cultura líquido ser mais rápido, o contato direto com o meio faz aumentar a velocidade de difusão dos nutrientes, favorecendo a multiplicação e a uniformidade dos explantes, mas quando o tempo de imersão é prolongado pode favorecer a vitrificação das gemas. Na preparação de meios sólidos são utilizados agentes de geleificação, o principal agente utilizado é o ágar (polissacarídeos extraídos de algas marinhas) embora outros agentes tem sido utilizados tais como o amido e uma nova classe polímeros produzidos por certas bactérias, o fita-gel. É necessário gelificar o ágar, para isto deve-se dissolvê-lo em água quente fervente e esperar esfriar (TORRES, et al. 1998).

Após a adição de todos os componentes de determinado meio nutritivo, ajusta-se o pH do meio para um valor ligeiramente ácido (entre 5 e 6), neste processo utiliza-se HCl e NaOH para realizar o ajuste. O meio preparado é acondicionado em frascos e após são autoclavados a 121°C por 15 a 20 minutos. Quando resfriado o meio será utilizado propagação de certa espécie (TORRES, et al., 1998).

4.5.5.3 - Reguladores de crescimento:

A possibilidade de manipulação da totipotência, em última análise, depende do tipo e da concentração relativa dos principais reguladores de crescimento, como indicado pelo já clássico trabalho de Skoog e Miller (1957). Estes autores observaram que a relação entre a

auxina e a citocinina no meio de cultura era responsável pela resposta organogenética/embriogenética em tecidos vegetais.

Segundo Pino-Nunes (2009), a auxina e citocininas são essenciais ao desenvolvimento das plantas, controlando os processos de divisão, expansão e diferenciação celular. A utilização de reguladores tem como função suprir possíveis deficiências dos teores endógenos de hormônios nos explantes.

As auxinas e as citocininas são as classes de reguladores de crescimento mais utilizadas em cultura de tecidos. O balanço hormonal entre citocininas e as auxinas é muito importante para o controle da morfogênese na cultura de tecidos (TORRES et al., 1998). Heichhorn et al. (2006) expõe outras classes de hormônios tais como as giberelinas, etileno, ácido abscísico, entre outros.

Nas plantas, as auxinas são sintetizadas em regiões de crescimento ativo como meristema apical, gemas axilares e folhas jovens e depois translocados para diferentes órgãos. Tem como função promover crescimento do caule, folhas e raízes, além de ser responsável pela dominância apical. Também promovem desenvolvimento de raízes adventíceas no caule (EICHHORN et al., 2006). As auxinas mais utilizadas para estimular a multiplicação é o ANA, seguido de AIB e AIA. Concentrações altas de auxinas podem estimular o enraizamento e a formação de calos em detrimento da multiplicação (TORRES et al., 1998).

As citocininas promovem divisão, alongamento e diferenciação celular, retardam a senescência das plantas, promovem a quebra de dominância apical e induzem a proliferação de gemas axilares (EICHHORN, et al., 2006). A citocinina mais utilizada é o BAP, seguido de cinetina e 6-BA. Sua aplicação na cultura de tecidos é o desenvolvimento da parte aérea e a indução de gemas adventíceas (TORRES et al., 1998).

Eichhorn et al. (2006) relatam que a aplicação das giberelinas induzem efeitos notáveis no alongamento de caule e folhas intactas tanto por estimular a divisão quanto o alongamento celular. Experimentos mostram que plantas anãs tratadas com GA₃ tornam-se indistinguíveis das plantas normais. Essa classe de hormônios estão presentes em todas as partes da planta, mas sua maior concentração ocorre em sementes imaturas. Os autores ainda apresentam a influência na dormência de sementes e o alongamento do escapo floral e florescimento.

5 MATERIAL E MÉTODOS:

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal (LFDGV) da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

5.1 - Obtenção de culturas assépticas:

Seleção da planta matriz:

A planta Matriz de Vetiver utilizada no presente estudo foi coletada em uma propriedade rural na baixada do Maciambú no município de Palhoça, SC. A mesma foi transferida, com o solo que estava previamente plantada, para um vaso de 2,5 litros e em câmara fitotron com temperatura (22°C) e fotoperíodo de 16 horas luz controlados, permaneceu por 14 dias antes da extração das gemas foliares.

Preparação dos explantes e desinfestação das gemas:

Para a preparação dos explantes a planta matriz foi primeiramente podada, lavada em água e detergente comercial e enxaguada em água corrente. Foram retiradas as gemas basais do colmo e com o auxílio de um estéreomicroscópio foram obtidos explantes com aproximadamente 0,3, 0,6 e 1,0 cm de comprimento.

Em câmara de fluxo laminar (CFL) os explantes foram imersos em álcool 70%, durante 30 segundos e lavados em água destilada e autoclavada, submetidos a diferentes tempos de imersão em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%) adicionada de três gotas de detergente Tween 20, recebendo posteriormente a tríplice lavagem. Os explantes foram mantidos em água destilada e autoclavada até o momento da inoculação.

Após a inoculação, as culturas foram mantidas em sala de crescimento com temperatura (22°C), fotoperíodo de 16 horas de luz e luminosidade controladas. As culturas não contaminadas foram mantidas em sala de crescimento durante 60 dias para posterior repicagem do material.

Materiais de laboratório e meio de cultura:

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e suplementado com 30g.L⁻¹ de sacarose, 7g.L⁻¹ de ágar, 2 µM de ANA e 4 µM BAP. O pH foi ajustado para 5,8 (+/-0,2) utilizando HCl (0,5N) e NaOH (0,5N), antes da autoclavagem (121°C) a 1,5 atm por 15 minutos. O meio de cultura então foi despejado em tubos de ensaio (2,4 x 15,0 cm) contendo 10 ml/tubo e após, fechados com tampas plásticas e selados com filme PVC.

Após os 60 dias os brotos induzidos foram repicados visando multiplicação. Nesta etapa foram utilizados 10 frascos de 300 ml contendo 30 ml de meio de cultura de mesma composição e mantidos por 75 dias na sala de crescimento.

Delineamento experimental e análise estatística:

Para a desinfestação dos explantes, as gemas foram submetidas a três diferentes tempos de imersão (5, 10 e 15 min) em solução comercial hipoclorito de sódio (2,5%) mais detergente Tween 20 para avaliar a taxa de desinfestação/sobrevivência do material cultivado. Foram testados 3 tratamentos com 3 repetições, sendo a unidade experimental três tubos de ensaio contendo uma gema em cada, totalizando 27 gemas avaliadas. A taxa de contaminação e sobrevivência foi avaliada após 20 dias em cultura, os dados obtidos foram submetidas ao teste χ^2 (p=0,05) e Tabela de Contingência com o auxílio do software Statgraphics versão 7.0.

5.2 - Efeitos do ANA e BAP na multiplicação de brotos e incremento de massa fresca:***Explantes utilizados, metodologia da inoculação e meio de cultura:***

Os explantes utilizados foram selecionados do experimento anterior. Os explantes tiveram suas raízes e folhas senescentes removidas. Em balança eletrônica de precisão, foi avaliada a massa fresca inicial e final de cada cultura para obtenção do incremento de massa fresca (IMF). Os explantes, para fins de homogeneidade, foram divididos em 3 categorias de massa (> 0.07 g, 0.04-0.07 g, <0.04 g) e cada repetição continha as 3 classes.

Os explantes foram cultivados em frascos de vidro de 300 ml contendo 30 ml/ frasco de meio de cultura. O meio utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com

vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30g.L^{-1} de sacarose e gelificado com 7g.L^{-1} de ágar. Diferentes concentrações de ANA e BAP foram testadas para o incremento da matéria fresca e número de brotos: testemunha, $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $2\text{ }\mu\text{M}$ BAP, $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $4\text{ }\mu\text{M}$ BAP, $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $8\text{ }\mu\text{M}$ BAP, $4\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $2\text{ }\mu\text{M}$ BAP, $8\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $2\text{ }\mu\text{M}$ BAP $2\text{ }\mu\text{M}$. O pH foi ajustado para 5,8 (+0,2) utilizando HCl (0,5N) e NaOH (0,5N). Após autoclavados por 15 minutos a 121°C os frascos foram fechados com tampas plásticas e selados com filme de PVC.

As gemas resultantes foram repicadas em meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30g.L^{-1} de sacarose, $2\text{ }\mu\text{M}$ de ANA, $8\text{ }\mu\text{M}$ de BAP e gelificado com 7g.L^{-1} de ágar. Os explantes foram divididos em 20 frascos e as culturas foram mantidas em sala de crescimento durante 50 dias. Esta multiplicação dos brotos visou à produção de novos explantes para o próximo experimento.

Delineamento experimental e análise estatística:

O delineamento experimental utilizado foi em blocos completos casualizados sob esquema fatorial [fatores: concentração de ANA (A) e concentração de BAP (B)]. Foram testados 6 tratamentos com 4 repetições e a unidade experimental foi composta por 3 frascos com 1 explante em cada. Os dados de número de gemas e o IMF foram coletados e analisados 75 dias após introdução das gemas e as médias (transformadas em $\log(x+2)$) foram submetidas análise de variância e teste de SNK a 5% de probabilidade com o auxílio do software Statgraphics versão 7.0.

5.3 - Efeitos de diferentes densidades de meio de cultura e de agentes geleificantes na multiplicação de brotos:

Explantes utilizados, metodologia da inoculação e meio de cultura:

Os aglomerados de gemas (clusters) utilizados foram selecionados a partir do subcultivo anterior. Cada cluster continha aproximadamente 15 brotos.

O meio de cultura utilizado foi o MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951), 30g.L^{-1} de sacarose, $2\text{ }\mu\text{M}$ de ANA e $8\text{ }\mu\text{M}$

de BAP. Foi avaliada a multiplicação de gemas em meio de cultura líquido e sólido gelei ficado com ágar 7g.L^{-1} e Phytigel® 2g.L^{-1} . O pH foi ajustado para 5,8 (+0,2) utilizando HCl (0,5N) e NaOH (0,5N).

Os frascos contendo 30 ml de meio de cultura foram autoclavados por 15 minutos a 121°C , fechados com tampas plásticas e selados com filme de PVC. No tratamento com meio líquido foram utilizados 20 ml de meio de cultura para que os explantes não ficassem totalmente submersos.

Após a inoculação os explantes foram transferidos e mantidos por 40 dias em sala de crescimento com temperatura (25°C) e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Delineamento experimental e análise estatística:

O experimento foi constituído de 3 tratamentos com 4 repetições, sendo a unidade experimental quatro frascos contendo 1 aglomerado com aproximadamente 15 brotos. As avaliações foram realizadas após 45 dias em cultura e as médias (transformadas em $\log(x+2)$) foram submetidas análise de variância e teste de Duncan a 5% de probabilidade com o auxílio do software Statgraphics versão 7.0.

5.4 - Efeito do GA_3 e ANA no desenvolvimento de plântulas:

Explantes utilizados, metodologia da inoculação e meio de cultura:

Os clusters utilizados foram selecionados em função do melhor resultado do experimento anterior e continham aproximadamente 15 brotos.

Foi utilizado o meio de cultura MS (Murashige & Skoog, 1962) suplementado com vitaminas de Morel (Morel & Wetmore, 1951) e 30g.L^{-1} de sacarose. Diferentes concentrações de ANA (0 e $2\text{ }\mu\text{M}$) e GA_3 (0, 5, 10 e $15\text{ }\mu\text{M}$) foram testadas compondo os seguintes tratamentos: testemunha, $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $0\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 , $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $5\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 , $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $10\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 , $2\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $15\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 , $0\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $5\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 , $0\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $10\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 , $0\text{ }\mu\text{M}$ ANA / $15\text{ }\mu\text{M}$ AG_3 . O pH do meio de cultura foi ajustado para 5,8 (+0,2) utilizando HCl (0,5N) e NaOH (0,5N).

Os frascos, adicionados de 30 ml de meio de cultura, foram autoclavados por 15 minutos a 121°C, fechados com tampas plásticas e selados com filme de PVC.

Após a inoculação as culturas foram mantidas por 30 dias em sala de crescimento com temperatura (25°C), fotoperíodo de 16 horas de luz e intensidade luminosa controlada.

Delineamento experimental e análise estatística:

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos completos casualizados em esquema fatorial (fatores: diferentes concentrações de GA₃ (A) e concentração de ANA (B)). Foram testados 8 tratamentos com 3 repetições e a unidade experimental era composta 3 de frascos com 3 clusters cada. A observação do número de plantas acima de 4cm e o número de folhas por planta dos aglomerados foi realizada após 30 dias da introdução das plantas e as médias [transformadas em log (x+2)] foram submetidas análise de variância e teste de Duncan a 5% de probabilidade com o auxílio do software Statgraphics versão 7.0.

5.5 - Aclimatização de plântulas de Vetiver:

Origem das plântulas:

As plântulas utilizadas na aclimatização foram selecionadas do experimento de multiplicação. Para retirar o excesso de meio de cultura das raízes as plântulas foram lavadas em água corrente, separadas e as raízes e folhas senescentes foram removidas. Para fins de homogeneidade cada repetição dos tratamentos possuía as três classes de tamanho: classe I- < 6 cm; classe II- entre 7-10 cm, classe III- >10 cm.

Substratos, metodologia do plantio e aclimatização:

Para avaliar o desenvolvimento das plantas no processo de aclimatização foram testados três tipos de substratos: casca de arroz carbonizada, composto orgânico e espuma fenólica. Foram utilizadas bandejas de isopor (72 unidades) para a aclimatização das plantas.

Após o plantio, as bandejas foram mantidas em casa de vegetação com irrigação por sistema de aspersão.

Delineamento experimental e análise estatística:

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos completos casualizados tendo como fator diferentes substratos. A unidade experimental constitui-se de quatro plantas divididas na bandeja. Foram utilizadas 3 repetições, totalizando 12 plântulas por tratamento e 108 no experimento. Avaliou-se o tamanho da maior raiz, sobrevivência das plantas e o comprimento da folha mais alta após 30 dias da realização do experimento. As médias (transformadas em $\log(x+2)$) foram submetidas à análise de variância e ao teste de SNK a 5% de probabilidade com o auxílio do software Statgraphics versão 7.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO:

6.1 - Obtenção de culturas assépticas:

Visando a produção massal do Vetiver, gemas retiradas da base do colmo foram submetidas aos diferentes tratamentos em hipoclorito de sódio para desinfestação dos explantes. O local da planta da onde é retirado o explante tem efeito na contaminação do mesmo. Na etapa de desinfestação das gemas, Gámez et al. (2008), relataram uma alta taxa de contaminação do material quando os explantes eram retirados das gemas laterais do colmo, enquanto gemas basais apresentaram baixa taxa de contaminação.

Foi possível observar que o tamanho dos explantes também influenciou na contaminação do material propagado, gemas que apresentavam 1 cm sobreviveram a todos os tratamentos porém, todas contaminaram; gemas com 0,3 cm eventualmente contaminaram mas diversas amostras não resistiram ao hipoclorito de sódio. Enjalric (1988) em seu trabalho com *Hevea brasiliensis*, observou que gemas de 0,1 mm obtiveram 26% de contaminação, enquanto gemas com 3 mm obtiveram 79% de contaminação. Para fins de homogeneidade os tamanhos das gemas utilizadas foram de 0,3; 0,6 a 1 cm de comprimento. No presente trabalho foi observado que a maioria das gemas com 0,3 cm não resistiram ao tratamento em hipoclorito. Ao contrário, gemas com 1 cm resistiram ao tratamento, porém a desinfestação não foi eficiente. Gemas com 0,6 cm (**Figura 2**) resistiram aos diferentes tratamentos e

apresentaram baixa contaminação quando submersas em 5 e 15 minutos em hipoclorito de sódio.

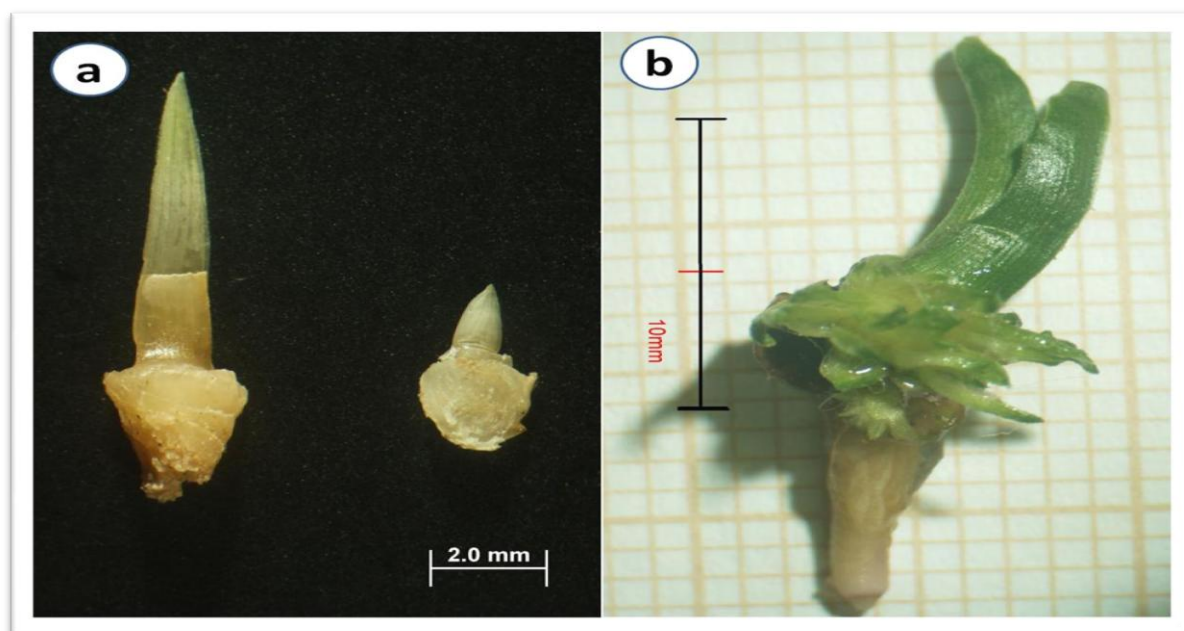


Figura 2: Gemas basais do colmo de *Chrysopogon zizanioides* a) gemas basais de diferentes tamanhos, observar os primórdios foliares; b) gemas basal induzida em meio de cultura MS suplementado com 2 µM de ANA e 4 µM BAP.

Não foi possível obter informações precisas sobre este ensaio, pois os dados analisados não apresentavam confiabilidade quando submetidos ao teste χ^2 ($p=0,05$) e análise Contingência submetidos, provavelmente pelo baixo número de amostras. Analisando a **Tabela 1**, pode-se observar que a baixa taxa de sobrevivência dos explantes está relacionada com a taxa de contaminação e pela ação do hipoclorito de sódio. Para fins de precisão deve ser considerada a realização de um experimento de desinfestação de gemas do colmo. A quantidade de gemas obtida foi o suficiente para a introdução de uma cultura asséptica do Vetiver.

Tabela 1: Taxa de contaminação e sobrevivência das gemas axilares de *Chrysopogon zizanioides* quando desinfestadas em diferentes tempos de imersão (5, 10, 15 min) em hipoclorito de sódio.

Tratamentos (min)	Taxa de contaminação (%)	Taxa de sobrevivência (%)
5	77	11
10	77	0
15	45	11

*A taxa de contaminação corresponde à proporção do material contaminado e a taxa de sobrevivência corresponde aos explantes sobreviventes ao tratamento em solução comercial de hipoclorito de sódio (2,5%).

6.2 - Efeitos do ANA e BAP na multiplicação de brotos e incremento de massa fresca:

Em relação à variável número de brotos, observa-se pela **Tabela 2**, que os meios de cultura suplementados com 4 e 8 μM de BAP apresentaram, pela análise da separação de médias, diferenças estatísticas sobre os outros tratamentos. Analisando os explantes gerados foi observada a formação de clusters que continham aproximadamente 15 brotos de Vetiver (**Figura 3-b**).

Tabela 2: Incremento de massa fresca e desenvolvimento de brotos de *Crhysopogon zizanioides* submetidos a tratamentos com reguladores (ANA e BAP) de crescimento em diferentes concentrações.

Tratamentos	Número de brotos	Incremento de massa fresca (g)
Testemunha	2.125 c	0.650 c
ANA (2 μM) + BAP (2 μM)	17.850 b	3.345 a
ANA (2 μM) + BAP (4 μM)	55.583 a	2.275 b
ANA (2 μM) + BAP (8 μM)	78.333 a	2.543 ba
ANA (4 μM) + BAP (2 μM)	16.330 b	2.983 ba
ANA (8 μM) + BAP (2 μM)	18.753 b	2.165 b
CV (%)	9.45	7.07

*Para fins de análise estatística os dados foram transformados em $\log(x+2)$. Médias acompanhadas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. Os valores da tabela referem-se às porcentagens originais não transformadas.

Van Be et al. (2008), observaram em um intervalo de 6 semanas um bom crescimento e desenvolvimento de gemas de Vetiver em meio de cultura suplementado com (2-4 mg/L) de BAP. Estes autores também notaram a formação de clusters em meio de cultura suplementado com BAP, porém, afirmam que apesar de apresentarem numerosos e pequenos brotos, os mesmos não são eficientes para a etapa de aclimatização. Os autores também observaram que a adição de 1 mg ANA no meio MS (Murashige & Skoog, 1962), desenvolvia um número maior de raízes por touceira (média de 19 raízes / touceira) em comparação ao meio isento de ANA (7,6 raízes / touceira). Vãn Ây e Vãn Hòa (2007) em seu experimento de multiplicação do Vetiver em sistema de imersão temporário relatam que a adição de 2 ppm de BAP mostraram os melhores resultados no crescimento e desenvolvimento de gemas. Santos et al.

(2007) afirmam que em 6 semanas a maior regeneração de plantas de Vetiver ocorreu utilizando de $3,45 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP e $0,06 \text{ mg.L}^{-1}$ de ANA. Gámez e Páez (2005) declaram que o meio de cultura suplementado com $10 \text{ } \mu\text{mol}$ BAP e $0,1 \text{ } \mu\text{mol}$ de AIB, em um intervalo de 6 semanas, uma boa taxa de multiplicação desta espécie. Lu et al (2004) mostraram que o meio MS suplementado com a combinação de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP e $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de 2,4-D foi melhor para a indução de calos de Vetiver, o meio ideal para induzir a diferenciação de brotações foi o meio MS com $3,5 \text{ mg.L}^{-1}$ BAP $3,5 \text{ mg}$ e $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA e as mudas foram enraizadas com sucesso em meio MS com $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ de BAP $3,0$ e $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de AIA.

De acordo com a **Tabela 2**, o tratamento ANA ($2 \text{ } \mu\text{M}$) + BAP ($2 \text{ } \mu\text{M}$) apresentou maior incremento de massa fresca, seguido por ANA ($4 \text{ } \mu\text{M}$) + BAP ($2 \text{ } \mu\text{M}$) e ANA ($2 \text{ } \mu\text{M}$) + BAP ($8 \text{ } \mu\text{M}$). Os dois primeiros tratamentos apresentavam uma grande quantidade de raízes que continham uma proeminência na base do colmo (**Figura 3-d**), enquanto o último apresentou maior número de brotos, assim é possível concluir que o ganho de biomassa não esteve relacionado com o número de brotos produzidos.

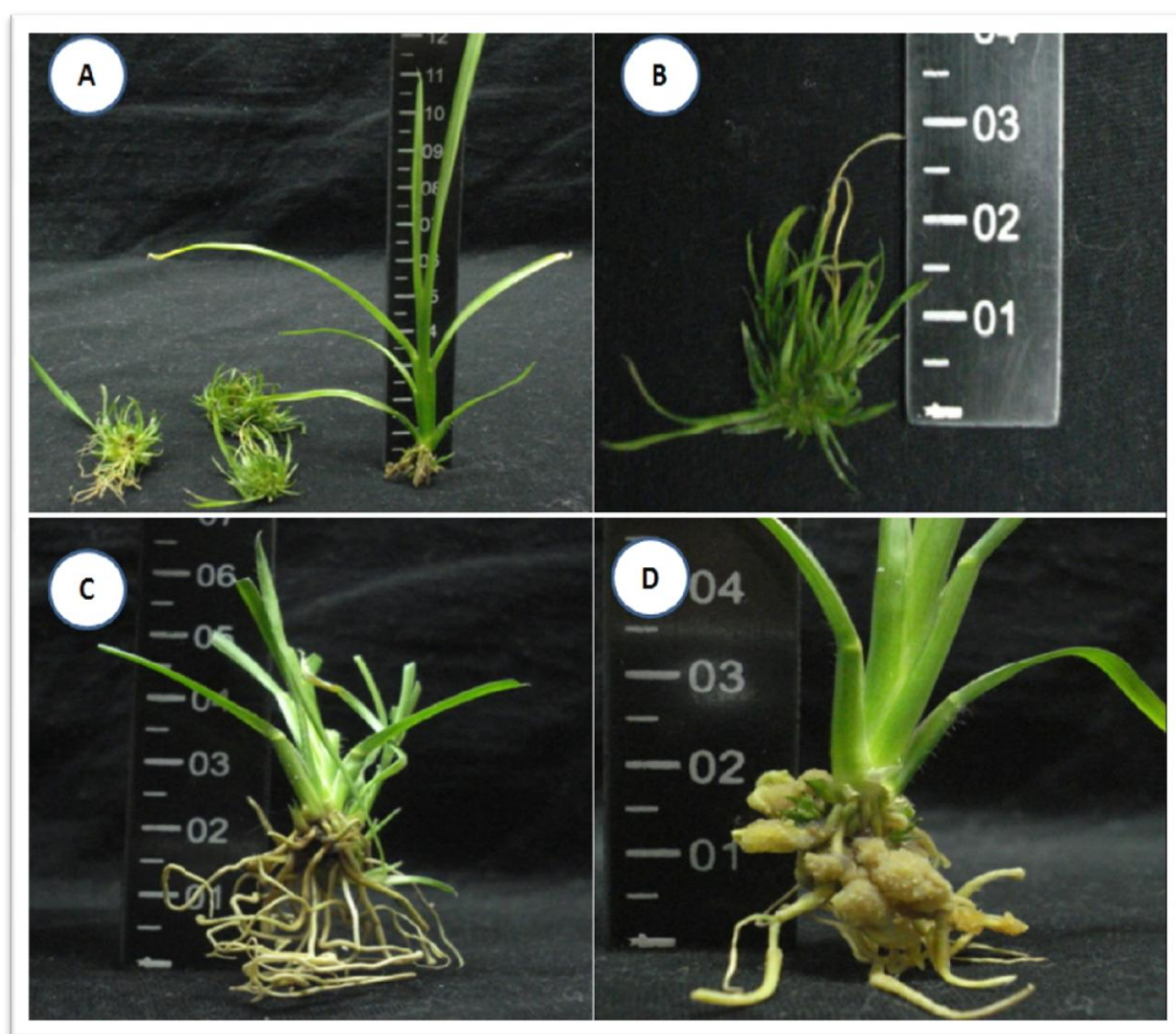


Figura 3: Desenvolvimento de *Chrysopogon zizanioides* em meios de cultura contendo diferentes concentrações de reguladores de crescimento (ANA e BAP). a)

plantas desenvolvidas em meio suplementado com ANA (2 μ M) + BAP (8 μ M); b) detalhe do aglomerado de gemas, com aproximadamente 15 brotos, desenvolvido em meio de cultura suplementado ANA (2 μ M) + BAP (8 μ M) e ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M); c) intenso desenvolvimento radicular em meio de cultura isento de reguladores de crescimento; d) detalhe da proeminência na base do colmo quando o meio era suplementado com ANA (8 μ M) + BAP (2 μ M).

6.3 - Efeitos de diferentes densidades de meio de cultura e de agentes geleificantes na multiplicação de brotos:

A utilização de meios de cultura de consistência líquida e com o agente geleificante Phytigel® proporcionaram um aumento significativo na taxa de multiplicação, especialmente quando o material vegetal foi cultivado no meio líquido (**Tabela 3**). Levin et al. (1997) afirmam que em meio líquido ocorre um aumento de contato dos explantes com os nutrientes dissolvidos em água, acelerando a difusão destes para a planta.

Tabela 3: Número de brotos de *Chrysopogon zizanioides* desenvolvidos em diferentes consistências de meio de cultura e agentes geleificantes.

Tratamentos	Número de brotos
Meio de cultura com ágar	30.437 b
Meio de cultura com Phytigel®	56.688 a
Meio de cultura líquido	63.500 a
CV (%)	9.6

*Para fins de análise estatística os dados foram transformados em $\log(x+2)$. Médias acompanhadas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os valores da tabela referem-se às porcentagens originais não transformadas.

Porém, em sua pesquisa com diferentes variedades de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) Karasawa et al. (2000) observaram que o número de brotos era maior em meio de cultura sólido que em líquido. Karasawa et al. (2000) apud George (1993) afirmam que a superioridade do meio sólido sobre o meio líquido pode ter ocorrido em resposta a perda de água da célula para o meio líquido devido ao potencial osmótico negativo do meio líquido, em relação ao meio sólido; ou por estresse hídrico, pois a cultura em ambiente natural não suporta o excesso de umidade dos solos mal drenados (KARASAWA, et al. 2000 apud

JACQUES, 1997), o que não acontece com o Vetiver que é natural de regiões alagadas do Sul Índia (TRUONG, et al. 2006).

Foi observada uma tendência ao desenvolvimento das folhas em clusters cultivados em meio sólido (ágar) enquanto nos outros tratamentos ocorreu um maior desenvolvimento de outros aglomerados (**Figura 4- a e b**). O meio de cultura líquido apresentou alta taxa de multiplicação dos clusters o meio suplementado com Phytigel® apresentou uma boa taxa de multiplicação de aglomerados, mas também ocorreu o desenvolvimento de suas folhas (**Figura 4 – c e d**). O tamanho dos folíolos dos clusters desenvolvidos em meio líquido eram menores em relação aos aglomerados do meio com Phytigel®, porém o número de brotos por aglomerado desenvolvidos no meio líquido eram superiores. Como o custo dos agentes geleificantes é caro, o meio líquido torna-se a melhor alternativa para a multiplicação de brotos.

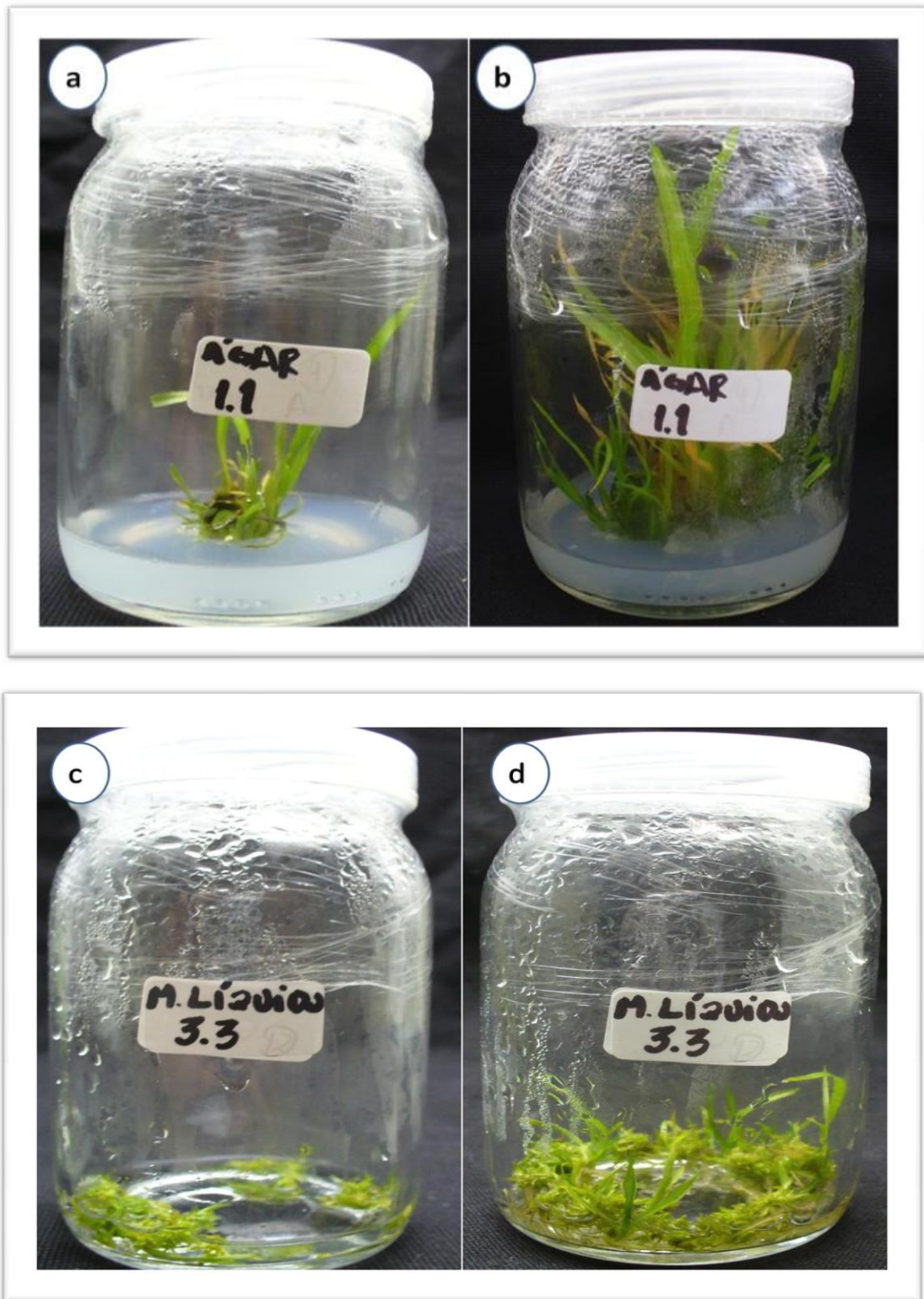


Figura 4: Desenvolvimento de clusters em meios de cultura em diferentes densidades e agentes geleificantes de *Chrysopogon zizanioides*. a e b) desenvolvimento foliar em meio de cultura com ágar; c e d) desenvolvimento de clusters em meio de cultura líquido.

6.4 - Efeitos do GA₃ e ANA no desenvolvimento de plântulas

A indução das gemas presentes nos clusters e o número de folhas por colmo foi favorecida pela ausência de auxina no meio de cultura. As diferentes concentrações de GA₃ não diferiram estatisticamente para ambas variáveis (**Tabela 4**).

Tabela 4: Influência do meio de cultura MS suplementado com GA₃ e ANA no desenvolvimento de colmos por cluster e de folhas por colmo em aglomerados de gemas de *Chrysopogon zizanioides*.

Tratamentos	Número de colmos			Número de folhas por colmo		
	0 µM ANA	2 µM ANA	Médias	0 µM ANA	2 µM ANA	Médias
0 µM GA ₃	10.45	3.67	7.06 a	3.38	1.75	2.57 a
5 µM GA ₃	13.22	8.33	10.78 a	1.97	2.18	2.08 a
10 µM GA ₃	9.78	9.33	9.56 a	1.56	1.93	1.75 a
15 µM GA ₃	10.78	6.00	8.39 a	1.90	1.28	1.59 a
Médias	11.06 a	6.83 b		2.20 a	1.79 b	
CV (%)	23,00		17,90	9,37		8,10

*Para fins de análise estatística os dados foram transformados em log (x+2). Médias acompanhadas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade. Os valores da tabela referem-se às porcentagens originais não transformadas.

Foi observada a presença de raiz em todos os aglomerados que possuíam pelo menos uma folha acima de 4 cm; tanto para meios com auxina quanto para os sem este fitoregulador. Porém, os tratamentos que não eram suplementados com reguladores de crescimento apresentavam uma grande quantidade de raízes e folhas robustas (**Figura 5-a**), aparentando ser mais vigorosos.

Muitos aglomerados presentes em meio de cultura com giberelina apresentavam sinais de toxidez (**Figura 5-b**), com o aumento da concentração ocorria também o aumento de sinais de toxicidade.

Segundo Heichhorn, et al. (2006) as giberelinas induzem o alongamento foliar, esse efeito foi notado nos aglomerados submetidos a esse regulador de crescimento. As folhas desenvolvidas nos diferentes tratamentos com giberelinas apresentaram alongamento foliar, porém suas folhas apresentavam crescimento desuniforme, eram delgadas e longas, menos verdes que folhas desenvolvidas em meio de cultura com ausência do regulador.

Aglomerados desenvolvidos em meio de cultura suplementado com 15 μM de GA_3 (com ou sem ANA) apresentavam tendência à expansão foliar, chegando a 25 cm de comprimento da folha dominante (**Figura 5-d**).

Alguns clusters desenvolvidos em meio suplementado com 10 μM de GA_3 apresentaram um crescimento mais homogêneo (**Figura 5-c**), porém muitos estavam com sinais de toxidez e suas folhas aparentemente frágeis talvez não resistissem à etapa de aclimatização.

A ausência de fitoreguladores (ANA e GA_3) no meio de cultura foi melhor para crescimento de folhas por planta. Para número de plantas desenvolvidas a ausência de ANA foi melhor e para GA_3 não houve diferenças. Por aparentar menos vigor, podemos inferir que o uso de reguladores de crescimento pode ser desfavorável para o desenvolvimento de plantas que serão aclimatizadas, deve ser realizados experimentos com plantas desenvolvidas em meio de cultura com GA_3 para verificar a taxa de sobrevivência dessas plantas em comparação as plantas cultivadas em meio de cultura sem reguladores.

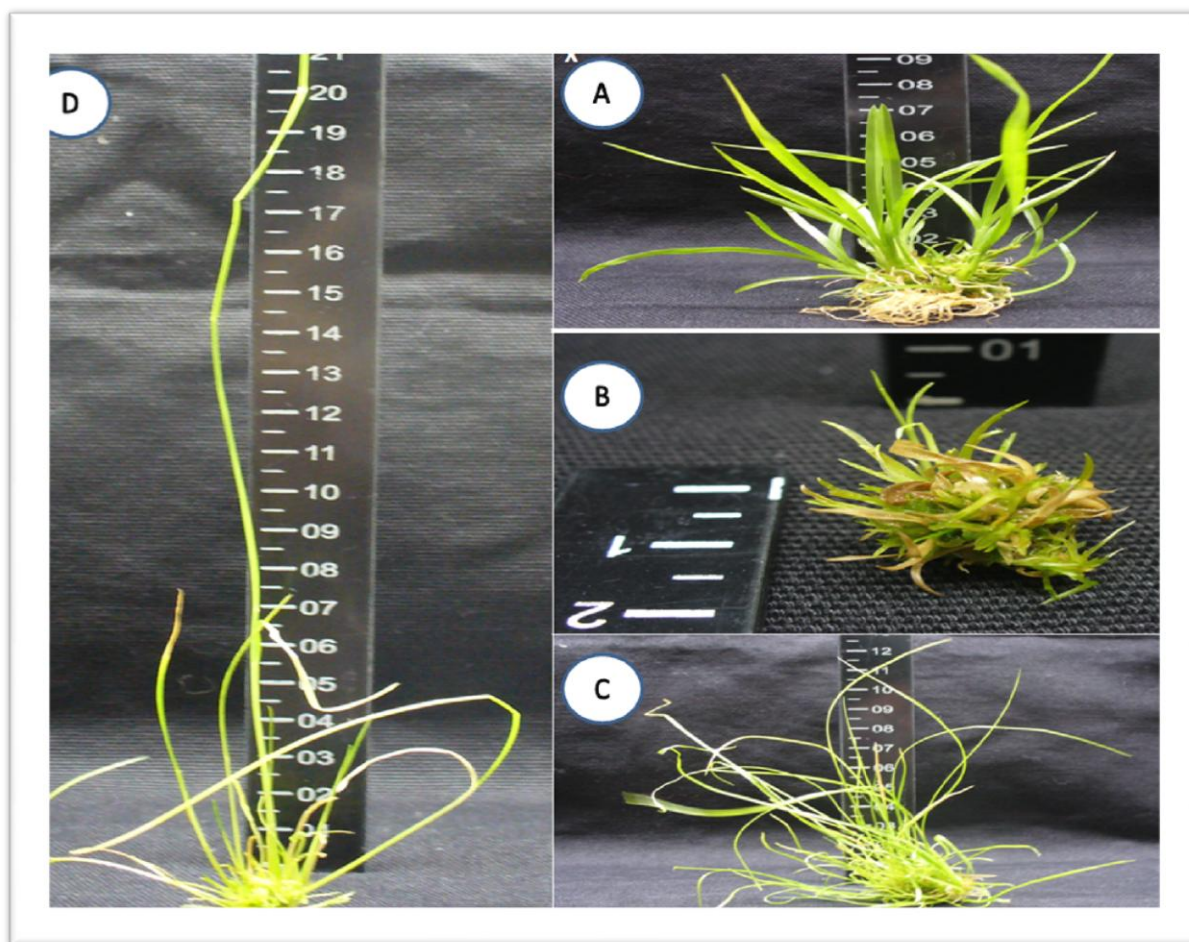


Figura 5: Desenvolvimento de clusters de *Chrysopogon zizanioides* em meio de cultura MS suplementado com GA_3 e ANA. a) observar a quantidade de raízes e vigor das folhas, meio sem reguladores de crescimento; b) aglomerados com sinais de fitotoxidez; c) aglomerado com crescimento homogêneo em meio

suplementado com 10 μM de GA_3 ; d) expansão foliar em meio suplementado com 15 μM de GA_3 .

6.5 - Aclimatização de plântulas de Vetiver

Analizando a **Tabela 5** podemos concluir que não houve diferença estatística para crescimento da folha e raiz entre os diferentes substratos utilizados.

Tabela 5: Crescimento de folha e raiz de *Chrysopogon zizanioides* cultivados em diferentes substratos.

Substrato	Crescimento folha (cm)	Crescimento raiz (cm)
Composto orgânico	2.60 a	5.29 a
Arroz carbonizado	2.29 a	4.53 a
Espuma fenólica	1.42 a	4.14 a
CV (%)	21,15	19,65

*Para fins de análise estatística os dados foram transformados em $\log(x+2)$. Médias acompanhadas de letras distintas indicam diferença significativa pelo teste de SNK a 5% de probabilidade. Os valores da tabela referem-se às porcentagens originais não transformadas.

Truong, et al. (2006) afirmam que o desenvolvimento do Vetiver é favorecido pelo aumento da incidência solar e em temperaturas médias de 25°C. Segundo dados do CIRAM, a temperatura média durante o período do experimento foi de 21,5°C em Florianópolis o que possivelmente atrasou o desenvolvimento do Vetiver. A baixa incidência solar dentro da câmara de vegetação também pode ter contribuído para o reduzido desenvolvimento. Apesar de não estar em condições ótimas, nenhuma muda de Vetiver plantada em bandejas de isopor morreu, e ainda apresentaram um crescimento razoável de raízes e folhas. Van Be, et al. (2008) relatam em seu trabalho com micropropagação do Vetiver, uma alta taxa de sobrevivência (>95%) na etapa de aclimatização, após 10 semanas, de clusters com 3 brotações acima de 5 cm.

Em seu trabalho com diferentes genótipos de capim elefante (*Pennisetum purpureum* Schum) Sobrinho et al. (2005), também relatam uma alta taxa de sobrevivência de plantas aclimatizadas em estufas. Em seu estudo concluíram que o tempo de multiplicação *in vitro* (15 e 90 dias) interferia na sobrevivência das plantas enquanto o tipo de substrato não interferia na mesma. Também não foram observadas diferenças estatísticas no comprimento da planta.

Pinto, et al. (2010) testaram o cultivo à campo de diferentes tipos de mudas de Vetiver procurando obter informações sobre a taxa de sobrevivência. Os mesmos autores afirmam que o plantio de mudas em raízes nuas desmembradas na hora apresentou taxa de sobrevivência inferior (86,85%) às mudas previamente preparadas em saquinhos de polietileno mantidos por 90 dias em viveiro (95,76% e 97,94%).

7 CONCLUSÕES:

- Não foi possível analisar estatisticamente a eficiência do tempo de imersão em hipoclorito de sódio na desinfestação de segmentos nodais de Vetiver devido ao baixo número de gemas disponíveis, mas foi possível realizar o estabelecimento de culturas assépticas.
- Os meios de cultura suplementados com ANA (2 μ M) + BAP (4 μ M) e ANA (2 μ M) + BAP (8 μ M) apresentaram diferenças estatísticas entre os outros tratamentos quanto ao número de brotos multiplicados, especialmente para o primeiro. Os meios de cultura contendo ANA (2 μ M) + BAP (2 μ M), (4 μ M) + BAP (2 μ M) e ANA (2 μ M) + BAP (2 μ M) apresentaram maior incremento de peso durante o experimento em relação aos outros tratamentos, principalmente o primeiro citado. Foi observado que não existe relação entre o incremento de peso e o aumento do número de brotos produzidos.
- O meio de cultura líquido e o meio de cultura sólido contendo o geleificante Phytigel® apresentaram melhores resultados para desenvolvimento de brotos se comparado com o meio de cultura com ágar, especialmente o meio líquido.
- A ausência de ANA no meio de cultura influenciou positivamente a indução de colmos em clusters e o desenvolvimento das folhas de cada planta. As diferentes concentrações de GA₃ não diferiram estatisticamente para ambas variáveis.
- Não houve diferenças significativas para crescimento de folha e raiz entre os substratos (composto orgânico, casca de arroz carbonizado, espuma fenólica). Todas as plantas sobreviveram ao processo de aclimatização.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ANDRADE, S. R. M. de. Princípios da cultura de tecidos vegetais. **Embrapa Cerrado**. Planaltina, DF. Dezembro de 2002. Disponível em: www.cpac.embrapa.br/download/285/t Acesso: 03/06/2011

BARROS, G. C. de. **Estudo fitoquímico e avaliações da toxicidade aguda e atividades biológicas da raiz do Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash)**. Goiânia, 2008. Disponível em: http://bdtd.ufg.br/tesesimplificado/tde_arquivos/10/TDE-2009-09-21T195932Z-364/Publico/Dissertacao_Gilvana_Barros.pdf Acesso: 20/05/2011.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C.. **Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1 º edição. Curitiba, 2009.

CHOMCHALOW, N.. The Utilization of Vetiver as Medicinal and Aromatic Plants, with Special Reference to Thailand. **Pacific Rim Vetiver Network Technical Bulletin**. Bangkok, Thailand 2001. Disponível em: http://www.vetiver.org/PRVN_med_aro%20doc.pdf Acesso: 23/05/2011.

CHOMCHALOW, N.; NANAKORN, W.. **Uses and Utilization of Vetiver**. Tailândia, 2003. Disponível em: http://vetiver.com/ICV3-Proceedings/THAI_other%20uses.pdf acesso em: 27/05/2011

CID, L. P. B.. Cultura de tecidos vegetais - uma ferramenta fundamental no estudo da biologia moderna de plantas. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento** P.17-21. Brasília, DF, 2001.

DAMIANO, C., PALOMBI, M. A., La micropropagazione 20 anni dopo: innovazioni tecniche e ottimizzazione dei protocolli delle colture in vitro. **Rivista de Frutticoltura**, Bologna - Itália,n. 2, 2000. p. 48 – 55.

EICHHORN, S. E.; EVERT, R. F.; RAVEN, P. H.. **Biologia vegetal**. Estados Unidos, 2006.

ENJALRIC, F.; CARRON, M.P.; and LARDET, L. and. Contamination of primary cultures in Conclusion tropical areas: The case of *Hevea brasiliensis*. **Acta Horticulturae** **25: 57-65**. London,1988.

FELDBAUM, C.. Biotecnologia – As oportunidades que surgem Apartir da “vida”. **Radar da inovação**, 4º edição. Campinas, 2004. Disponível em: http://www.institutoinovacao.com.br/downloads/inovacao_biotechnologia.pdf Acesso em: 05/07/2011

GÁMEZ A.; PÁEZ, de C.. **Propagación *in vitro* del pasto Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) utilizando diferentes explantes y médio de cultivo**. Maracay, Venezuela, 2005. Disponível em <http://www.vetiver.com/ICV4pdfs/EB27es.pdf> Acesso 03/06/2011

GONÇALVES, F. B.; HOLANDA, F. S. R.; ROCHA, I. P. da; RIBEIRO, L. F.; NASCIMENTO, A. A.; FILHO, R. N. de A., GÓIS, S. S.. Alteração de paisagem com uso da bioengenharia de solos nas margens dos rios São Francisco e Paramapapema, estado de Sergipe. **XVII Encontro de Iniciação Científica**. Sergipe, Outubro de 2007. Disponível em: http://www.posgrap.ufs.br/down/Livro_Resumos_17EIC_3EPG.pdf Acesso em: 05/06/2011.

GRIMSHAW, R. G.. Vetiver System: A Green Investment for Sustainable Development. **The Fourth International Conference on Vetiver**. Caracas, Venezuela, 2006. Disponível em: <http://www.vetiver.org/ICV4pdfs/P02.pdf> Acesso: 23/05/2011

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O.. **Apostila de Biotecnologia CCA/UFSC**. Versão Steinmacher (2006). .pdf>. Acesso em: 02/06/2011.

HENRIQUE, J.. Uso do Capim Vetiver para contenção e combate à erosão: estudo de caso Petrópolis/RJ (2008). **Recuperação de áreas degradadas**. Porto Alegre, Abril de 2010.

KARASAWA, M. M. G.; PINTO, J. E. B. P.; PINTO, J. C.; PEREIRA, A. V. Proliferação de capim-elefante em diferentes concentrações de regulador de crescimento e consistências do meio de cultura. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 26, n. 6, p. 1243-1251, nov./dez. 2002. Disponível em: http://www.editora.ufla.br/site/_adm/upload/revista/26-6-2002_17.pdf Acesso em: 17/06/2011

LEVIN, R.; ALPER, Y.; STAV, R.; WATAD, A. Methods and apparatus for liquid media and semi-automated micropropagation. **Acta Horticulturae**, Wageningen,v. 447, p. 659-663, 1997

LU, H.; BI-RONG, L.; CHAO, P.; XIAO-PING Z.. Tissue culture and rapid propagation of *Vetiveria zizanioides*. **Jornal da Universidade**

Normal de Anhui (Ciências Naturais). China, abril de 2004. Disponível em: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTOTAL-AHSZ200404019.htm Acesso: 05/06/2011

MOREL, G.; WETMORE, R.M. Fern callus tissue culture. **American Journal of Botany**, Colombia, v. 38, p. 141-143, 1951.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F.. A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, p. 495-497. 1962

NEI, P. J.; BOM, E. P. da S.; FERRARA, M. A.. Tecnologia de Bio-processos. **Séries em Biotecnologia**. Rio de Janeiro, 2008. Disponível em: <http://www.eq.ufrj.br/vestibular/nukleo/pdfs/series-em-biotecnologia-vol-i-tecnologia-de-bioprocessos.pdf> Acesso em: 05/07/2011

ORIHUELA, J. A.. **Manual sobre El uso y manejo del pasto Vetiver** (Chrysopogon zizanioides). Lima, Peru 2007. Disponível em: www.vetiver.org/TVN_manualvetiver_spanish-o.pdf Acesso: 05/06/2011.

PEREIRA, A. R.. O uso do Vetiver na estabilização de taludes e encostas. **Boletim Técnico nº 3**. Belo Horizonte, Minas Gerais, 2006. Disponível em: <http://www.deflor.com.br/portugues/pdf/boletim3.pdf> Acesso em: 23/05/2011.

PINO-NUNES, L. E.. **Controle do desenvolvimento vegetal pela interação auxina-citocinina. Uma nova abordagem baseada no estudo de mutantes de tomateiro (Solanum lycopersicum cv Micro-Tom)**, Piracicaba-SP, 2009. Disponível em <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/64/64133/tde-15102009-112355/pt-br.php> Acesso 05/06/2011.

PINTO, L. V. A.; PEREIRA, M. W. M.; SOUZA, R. X. de; PEREIRA, A. J.; COBRA, R. L. **Sobrevivência de mudas do campim vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) em raízes nuas e produzidas em saquinhos de polietileno plantadas em diferentes espaçamentos.** Inconfidentes/MG, 2010. Disponível em: <http://www.ibeas.org.br/Congresso/Trabalhos2010/XI-020.pdf> Acesso: 23/05/2011.

SANTOS, T. C.; FÁTIMA, M de; OLIVEIRA, A. M. S. de; COSTA, A. S. de; BLANK, A. F.. Influência de diferentes concentrações de BAP e ANA na multiplicação in vitro de Vetiver [*Chrysopogon zizanioides* (L.) Roberty]. **XVII encontro de iniciação científica**, pg 160. Sergipe, 2007. Disponível em: www.posgrap.ufs.br/down/Livro_Resumos_17EIC_3EPG.pdf Acesso: 05/06/2011.

SKOOG, F.; MILLER, E. O.. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultures in vitro. **11 th Symposium Society Experimental Biology** 11:118-131. 1957

SOBRINHO, F. de S.; PEREIRA, A. V.; LÉDOL, F. J. da S.; OLIVEIRA, J. S. e; VARGAS, S. M. Aclimatização de germoplasma de capim-elefante, pós cultivo in vitro; **Ciênc. agrotec.** vol.31 no.1 Lavras Jan./Feb. 2007 Minas Gerais, 2005. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542007000100001 Acesso em: 19/06/2011

TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSTO, J. A.. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**, volume 1.. Brasília,DF. 1998

TRUONG, P.; VAN, T. V., PINNER, E.. **Vetiver system applications: Technical Reference Manual**. Vietnam, 2006. Disponível em: http://www.vetiver.org/TVN-Manual_Vf.pdf Acesso em 19/05/2011

VÃN ÂY, N.; VÃN HÒA N. G. H.. Application of Temporary Immersion Bioreactor Technique to Micropropagation of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). **Tạp chí Khoa học**. Thailand, 2007.

VAN BE L.; TAN V. T.; UYEN, N. T. T.; DUNG L. V.. Low-cost Micropropagation of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.). **College of Agriculture & Applied Biology**. Can Tho City, Vietnam, Julho, 2008. Disponível em http://www.journal.au.edu/au techno/2008/jul08/journal121_article03.pdf Acesso em: 03/06/2011